Die Auswertung von Mehrkomponentensystemen der Kurzzeitspektrophotometrie

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Philipps-Universität
Marburg/Lahn

vorgelegt von

Reinhard Wodick
aus Hamburg

Marburg 1968

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Die Auswertung von Mehrkomponentensystemen der Kurzzeitspektrophotometrie

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Philipps-Universität
Marburg/Lahn

vorgelegt von

Reinhard Wodick
aus Hamburg

Marburg 1968

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 7.5.1968
Tag der mündlichen Prüfung am 18.5.1968
Berichterstatter: Prof.Dr. Wolter
Mitberichterstatter: Prof.Dr. Lübbers

Gedruckt mit Unterstützung der
"Stiftung Volkswagenwerk" und des
"Marburger Universitätsbundes"

Inhalt

Seite

Einleitung 6

1.Kapitel 8-19
Beschreibung biologischer Objekte, auf die die Verfahren der photometrischen Mehrkomponentenanalyse angewandt wurden.

1.1. Der Redoxzustand des Hämoglobins im lebenden Gewebe. 10

1.2. Die Spektren der Atmungsfermente. 12

1.3. Die Analyse von Nucleosidgemischen. . . . 16

2.Kapitel 20-45
Beschreibung der benutzten Apparaturen.

2.1. Das Rapidspektrophotometer nach Lübbers und Niesel. 20

2.2. Die elektronische Rechenmaschine PDP8. . 39

2.21. Periphere Geräte des Rechners PDP8. . . 42

2.22. Die Programmierung auf dem Rechner PDP8. 42

3.Kapitel 46-92
Physikalische Grundlagen der Spektrenentstehung im reflektierten und durchfallenden Licht.

3.1. Theoretische Beschreibung der Lichtausbreitung in den Objekten. 46

3.11. Die Reduktion des Systems partieller Differentialgleichungen in ein System gewöhnlicher Differentialgleichungen. 48

Seite

3.12. Die Lösung des Differentialgleichungssystems mit Hilfe des Matrizantenformalismus. 54

3.13. Die Übertragungsmatrix der Lichtausbreitung 58

3.14. Die Streumatrix der Lichtausbreitung . . 60

3.15. Die Anwendung der beschriebenen Theorie. 62

3.2. Experimentelle Untersuchungen zur Reflexionsphotometrie. 71

4.Kapitel 93-135

Die Auswertung eines N-Komponentensystems bei rein multiplikativer Farbmischung.

4.1. Die Auswertung der Extinktionskurven an N ausgewählten Wellenlängen. 95

4.2. Die Ausgleichsrechnung nach der Methode der kleinsten Quadrate von Gauß als ein Spezialfall der Orthogonalitätsmethode. . 97

4.3. Die Teilgebietsmethode. 101

4.4. Das Verfahren mit dem kleinsten Fehler für die errechneten Konzentrationen. . . 103

4.41. Anwendungen der beschriebenen Theorie. . 119

4.42. Beispiele für die zu erwartenden Fehler bei verschiedenen Auswertverfahren. . . . 123

4.43. Die Fehler bei der Analyse von Nucleotid- und Nucleosidspektren. 126

4.44. Die Berechnung der Größen h_μ und der Skalarprodukte (y, h_μ). 130

4.45. Extinktionsabhängige Meßfehler. 132

Seite

5.Kapitel 136-171
Die Unterdrückung von Gleichspannungsanteilen bei den Spektren des Rapidspektrophotometers.

5.1. Die Wirkung eines RC-Gliedes auf die Meßsignale 138

5.2. Die Darstellungsmöglichkeiten der durch das RC-Glied gegebenen Transformation im Hilbert-Raum 148

5.3. Unterschiede in den vorlaufenden und zurücklaufenden Signalen, die durch das RC-Glied hervorgerufen werden 153

5.4. Die Auswertung der Spektren bei Wechselstromkopplung 156

5.5. Isosbestische Wellenlängen 159

5.6. Die zeitliche Änderung der Spektren bei RC-Kopplung 167

6.Kapitel 172-194
Die Auswertung von Mehrkomponentenspektren mit Hilfe von digitalen und hybriden Rechenmaschinen .

6.1. Die Auswertung während der Messung mit einer digitalen Rechenmaschine 172

6.11. Die Auswertung mit dem Rechner PDP8 . . 174

6.111. Betrachtungen zur Genauigkeit des Verfahrens 178

6.12. Die Auswertung mit einem Rechner von 16-18 Bit Wortlänge 180

Seite

6.2. Die Auswertung der Summenspektren mit Analog- und Hybridrechnern 183

7.Kapitel 195-214

Die Auswertung spezieller Mehrkomponentensysteme bei einer Kombination von additiver und multiplikativer Farbmischung.

7.1. Untersuchungen an Objekten mit zwei Kompartimenten 199

Diskussion 215

Zusammenfassung 223

Literaturverzeichnis 225

Danksagung 238

Lebenslauf 239

Anhang 240-381

1. Programme in Algol und Fortran IV für die TR4 der Marburger Rechenanlage .

2. Programme in Fortran II und maschineninterne Programme für die PDP8 des Institutes für Angewandte Physiologie in Marburg .

(Der Anhang wurde nicht gedruckt. Interessenten mögen sich bitte an den Verfasser wenden.)

Einleitung

Wir haben das Ziel, an lebenden Organen und an speziellen Systemen in Küvetten Reaktionen zu erfassen, die in wenigen hundertstel Sekunden ablaufen. Da es sich um Reaktionsketten handelt, ergibt die chemische Isolation und Untersuchung der Komponenten nicht die Antwort auf die gestellten Fragen. Die physikalischen Eigenschaften, die sich für die Untersuchung anbieten, sind charakteristische Lichtabsorptionsspektren der einzelnen Substanzen.

Da die Spektren der einzelnen Substanzen sich in vielen Fällen nur wenig unterscheiden, besteht die Aufgabe darin, Auswertmethoden zu finden, bei denen möglichst wenig Information verloren geht.

Damit man schnell ablaufende Vorgänge erfassen kann und damit die Eigenbewegungen der lebenden Organe keinen störenden Meßfehler verursachen, ist man gezwungen, schnell registrierende Photometer zu benutzen. Mit der Konstruktion des Rapidspektrophotometers durch Lübbers und Niesel wurde dieses Problem gelöst; denn das Rapidspektrophotometer benötigt für die Aufnahme eines vollen Spektrums nur eine hundertstel Sekunde.

Bei Untersuchungen an lebenden Organen ist man in den meisten Fällen auf die Reflexionsphotometrie angewiesen. Deshalb werden in dieser Arbeit physikalische Grundlagen der Entstehung von Reflexionsspektren untersucht.

Es galt, das Problem zu lösen, die 24000 Meßwerte, die mit dem Rapidspektrophotometer in der Sekunde anfallen, zu erfassen und auszuwerten. Das Ziel ist, die Auswertung während der Messung vorzunehmen, damit kein zusätzlicher Fehler durch die Meßwertspeicherung entsteht und vor allem, um eine Prozeßsteuerung während der Reaktionen vornehmen zu können.

Für die Erfassung und Auswertung der Spektren steht die elektronische Rechenmaschine PDP8 mit einem 8K-Kernspeicher und zwei Magnetbandeinheiten zur Verfügung. Es ergab sich somit die Aufgabe, die Auswertung so auf das Rapidspektrophotometer und die Rechenmaschine abzustimmen, daß eine sofortige und möglichst genaue Auswertung möglich ist.

1.Kapitel

Beschreibung biologischer Objekte, auf die die Verfahren der photometrischen Mehrkomponentenanalyse angewandt wurden

In diesem ersten Kapitel sollen biologische Objekte beschrieben werden, die die Mehrkomponentenanalyse photometrischer Spektren wichtig erscheinen lassen.

In dieser Arbeit werden sonst fast ausschließlich die mathematischen und meßtechnischen Probleme der photometrischen Mehrkomponentenanalyse behandelt. Damit aber der Leser vom Anfang an einen Überblick hat, welche biologischen Vorgänge wir erfassen möchten, wurde diese Beschreibung der Objekte an den Beginn der Arbeit gestellt. Denn erst die Besonderheit der betrachteten biologischen Vorgänge rechtfertigt den zum Teil erheblichen mathematischen und meßtechnischen Aufwand.

Um photometrische Messungen an lebenden Objekten durchführen zu können, benötigt man speziell für diesen Zweck konstruierte Photometer. Denn die Eigenbewegungen der Tiere dürfen den Meßvorgang nicht beeinflussen. Dieses Problem wurde von Lübbers und Niesel durch die Konstruktion des Rapidspektrophotometers gelöst [65], [74]. Das Rapidspektrophotometer benötigt für die Aufnahme eines gesamten Spektrums nur 0,01sec. Die Eigenbewegungen der Tiere spielen während dieser Momentaufnahme keine Rolle. Mit der hohen Meßgeschwindigkeit müssen wir ein ungünstiges Signalrauschver-

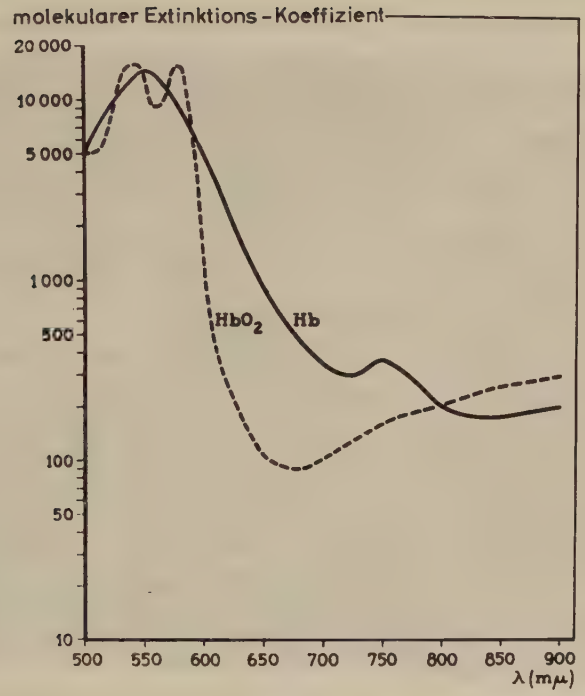


Abb.1.1. Molekulare Extinktionskoeffizienten für oxygeniertes und reduziertes Hämoglobin in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ.
Hb= reduziertes Hämoglobin
HbO_2= oxygeniertes Hämoglobin

hältnis in Kauf nehmen. Dadurch, daß wir alle gemessene Information zur Auswertung heranziehen, gelingt es uns trotzdem, relativ genaue Ergebnisse zu bekommen.

1.1. Der Redoxzustand des Hämoglobins im lebenden Gewebe

Das reduzierte und oxygenierte Hämoglobin unterscheiden sich durch die Absorptionsspektren im sichtbaren Licht. Auf der Abbildung 1.1 sind die molekularen Extinktionskoeffizienten vom reduzierten und oxygenierten Hämoglobin wiedergegeben.

Eine wässerige Hämoglobinlösung stellt ein relativ einfaches Zweikomponentensystem dar. Durch die Messungen der Extinktion solcher Lösungen kann man relativ leicht mit der im vierten Kapitel behandelten Theorie die Konzentrationen und den Oxygenierungsgrad berechnen.

Bereits sehr viel schwieriger ist die Messung des Oxygenierungsgrades im lebenden Gewebe. Man muß dabei berücksichtigen, daß das Hämoglobin nicht homogen über die Probe verteilt ist. Die Abbildung 1.2 zeigt die Oberfläche eines Meerschweinchengehirnes. Der Farbstoff Hämoglobin ist nicht gleichmäßig verteilt, denn man findet das Hämoglobin nur in den Blutgefäßen. Diese Kompartimentierung bedingt, daß es sich nicht um eine reine multiplikative Farbmischung, sondern daß es sich um eine Mischform von additiver und multiplikativer Farbmischung handelt.

Abb.1.2. Photographie eines Meerschweinchengehirnes mit oberflächlichen Blutgefäßen.

1.2. Die Spektren der Atmungsfermente

Der hohe Stoffwechsel der Warmblüterorgane ist nur möglich, wenn die Energie auf ärobem Wege gewonnen wird. Die Energiegewinnung erfolgt mit Hilfe der Atmungskette. Die Konzentration und Kinetik der Atmungskettenfermente bestimmen die maximale Stoffwechselgröße eines Organes. Für die Erforschung der Vorgänge, die mit der Atmungskette zusammenhängen, ist es sehr wesentlich, daß die Atmungsfermente charakteristische Absorptionsspektren im sichtbaren Licht besitzen. Es ist daher möglich, die Konzentration und den Redoxzustand der Atmungsfermente photometrisch zu messen. Auf den Abbildungen 1.3, 1.4 und 1.5 sind die Spektren der oxydierten und der reduzierten Cytochrome a, b und c wiedergegeben. Dadurch, daß diese Atmungsfermente im oxydierten oder im reduzierten Zustand vorliegen, bilden die erwähnten drei Cytochrome ein System aus sechs Komponenten. Diese Cytochrome kommen in praktisch allen Zellen vor, zumeist an Mitochondrien oder ähnliche Strukturen gebunden. Bei der chemischen Isolation der einzelnen Enzyme zerstört man diese Strukturen,und damit erlöscht auch weitgehend die Fähigkeit des Sauerstofftransportes. Aber gerade diesen Sauerstofftransport wollen wir bei verschiedenen Organen studieren. Daher bietet sich die Reflexionsphotometrie an den lebenden Organen als Methode an, die nur geringen Eingriff in die empfindli-

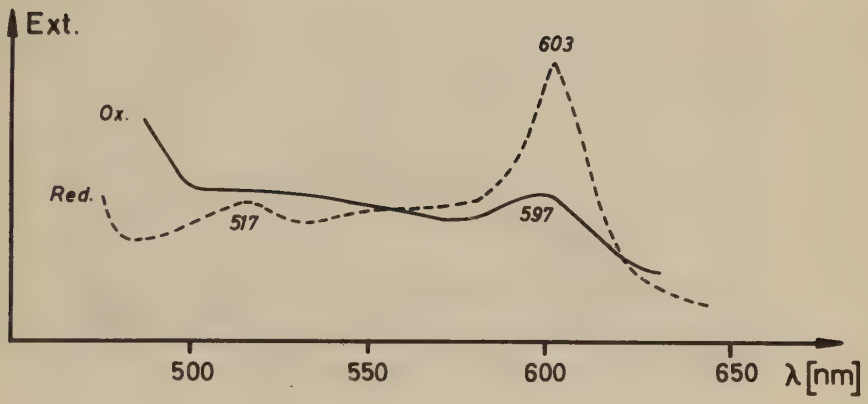


Abb.1.3. Molekulare Extinktionskoeffizienten für reduziertes (gestrichelte Kurve) und oxydiertes Cytochrom a in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ.

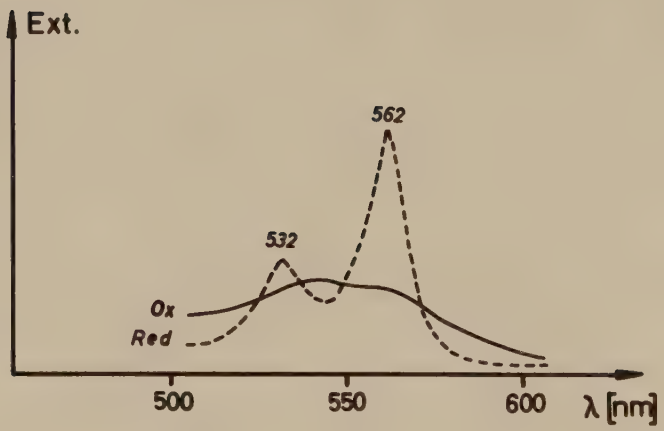


Abb.1.4. Molekulare Extinktionskoeffizienten für reduziertes (gestrichelte Kurve) und oxydiertes Cytochrom b in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ.

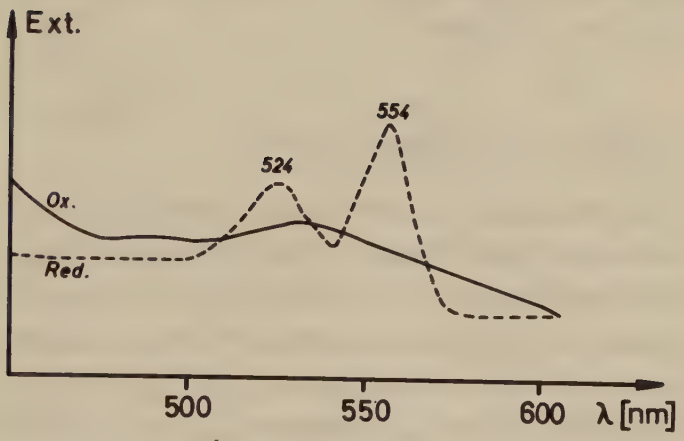


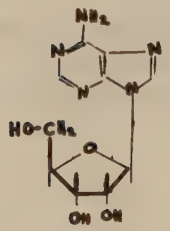
Abb.1.5. Molekulare Extinktionskoeffizienten für reduziertes (gestrichelte Kurve) und oxydiertes Cytochrom c in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ.

chen Strukturen nötig macht. Physikalische Grundlagen dieser Reflexionsphotometrie und die Methoden der Auswertung der gemessenen Spektren sind Gegenstand dieser Arbeit. Häufig sind wir gezwungen, da die Atmungsfermente in sehr viel geringeren Konzentrationen als das Hämoglobin vorliegen, die Organe hämoglobinfrei zu perfundieren. [44]

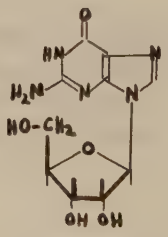
1.3. Die Analyse von Nucleosidgemischen

Man weiß, daß die genetische Information in den Zellen in der Basensequenz der Desoxyribonucleinsäure und Ribonucleinsäure verschlüsselt ist. Die Erforschung der Probleme der molekularen Genetik stehen heute im Brennpunkt der biologischen Wissenschaften. Es erschien uns deshalb besonders reizvoll, die Verfahren der Mehrkomponentenanalyse auf die Nucleosidgemische anzuwenden.

Die Nucleoside unterscheiden sich durch die Spektren im ultravioletten Licht. Auf dem unteren Teil der Abbildung 1.6 sind die Spektren der Purinderivate

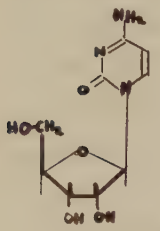


Adenosin

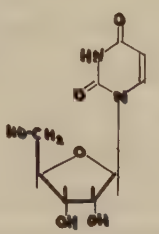


Guanosin

und die Spektren der Pyrimidinderivate



Cytidin



Uridin

wiedergegeben.

Die Spektren wurden als Absorptionsspektren von klaren Lösungen im durchfallenden Licht aufgenommen. Die Form der Spektren hängt von der Wasserstoffionenkonzentration ab. Die hier wiedergegebenen Spektren sind bei einer Wasserstoffionenkonzentration von pH=7 aufgenommen. Im alkalischen Milieu (pH=12) ist speziell die Unterscheidung von Adenosin und Uridin besser möglich.

Die obere Hälfte der Abbildung 1.6 zeigt ein Nucleosidgemisch aus 28% Adenosin, 33% Cytidin, 23% Guanosin und 16% Uridin. Die Aufgabe besteht darin, derartige Summenspektren nach ihren Grundkomponenten zu analysieren. Zum Beispiel bei der enzymatrischen Spaltung der hochmolekularen Ribonucleinsäuren bekommt man Nucleosidgemische, deren Komponenten man ermitteln möchte. Die photometrische Erfassung der Komponenten erfordert bei der Verwendung

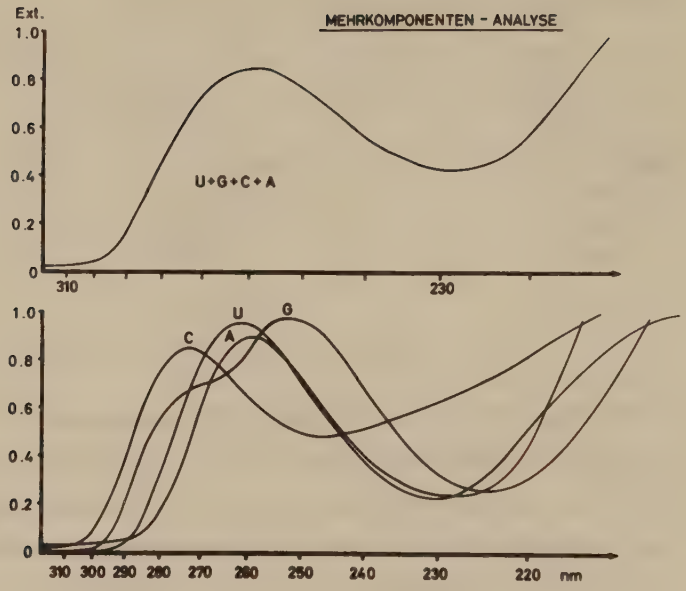


Abb.1.6.

Untere Hälfte: Spektren der vier Nucleoside A: Adenosin, G: Guanosin, C: Cytidin, U: Uridin bei einer Wasserstoffionenkonzentration von pH=7.

Obere Hälfte: Ein Summenspektrum aus 28% Adenosin, 33% Cytidin, 23% Guanosin und 16% Uridin.

eines schnellen Photometers und einer elektronischen Rechenmaschine nur einen Bruchteil der Zeit von den üblichen chemischen Trennverfahren. Speziell mit dem Rapidspektrophotometer (siehe Kapitel 2) benötigt man für die Aufnahme und Auswertung nach den vier Komponenten nicht mehr als 3/100 Sekunden Zeit. Man ist damit in der Lage, auch schnell ablaufende Vorgänge zu erfassen, sofern sie mit einer Extinktionsänderung einhergehen, was häufig der Fall ist.

Wie im vierten Kapitel dargelegt ist, wird für die Mehrkomponentenanalyse derartiger Summenspektren das Auswertverfahren gesucht, welches einen möglichst geringen Fehler erwarten läßt. Es sind dies im Gegensatz zu den sonst üblichen Auswertverfahren Verfahren, die das gesamte gemessene Spektrum mit zur Auswertung heranziehen.

2.Kapitel

Beschreibung der benutzten Apparatur

2.1. Das Rapidspektrophotometer nach Lübbers und Niesel

Das Rapidspektrophotometer ist ein Zweistrahlphotometer und zeichnet sich durch seine hohe Registriergeschwindigkeit aus. Es gestattet Extinktions- und Reflexionsmessungen in den Wellenlängenbereichen 350-700 nm oder 230-600nm, je nachdem welches der beiden mitgelieferten Gitter benutzt wird. Die Registrierung eines Spektrums, bestehend aus ca. 230 diskreten Meßpunkten, benötigt nur eine 1/100 Sekunde. In den neueren Modellen wird etwa die doppelte Anzahl an Meßpunkten erreicht. Die hohe Registriergeschwindigkeit ist besonders bei lebenden biologischen Objekten nötig, aber sie kann auch zur Erfassung schnell ablaufender chemischer und physikalischer Vorgänge dienen. Die Eigenbewegungen der Versuchstiere verursachen während der kurzen Aufnahmezeit kaum Fehler. Der Prototyp des Rapidspektrophotometers wurde von Lübbers und Niesel in den Jahren 1956-1959 im Eigenbau hergestellt[64,65,73]. Die Weiterentwicklung und weitere Fertigung erfolgt durch die Meßgeräteabteilung der Kieler Howaltwerke.[74] 1)

Auf der Abbildung 2.1 ist das neuste Modell des Rapidspektrophotometers zu sehen.

Die Spektren können in stetiger Folge auf dem Schirm eines Oszilloskops sichtbar gemacht werden. Die hohe Aufnahmerate garantiert ein für das Auge ruhiges Bild, auch ohne lang nachleuchtende Oszillographenschirme.

Bei physiologischen Experimenten ist diese visuelle

1) Heute werden Serien von 5-10 Stück gebaut, wobei der Preis für ein deratiges Gerät etwa 180 000DM beträgt.

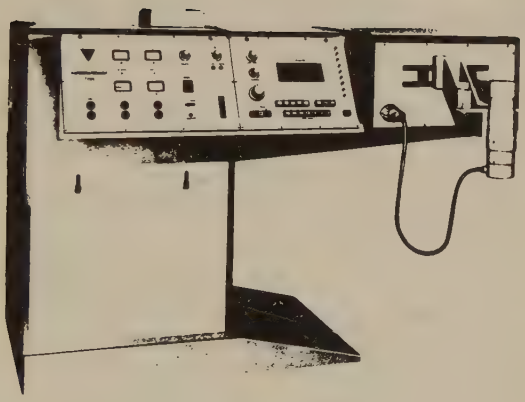


Abb.2.1. Das Rapidspektrophotometer
nach Lübbers und Niesel.

Kontrolle der Spektren von besonderer Wichtigkeit, sie gestattet in vielen Fällen eine Aussage über den Zustand der Versuchstiere. Man kann verhindern, daß das Tier stirbt oder irreversiblen Schaden nimmt und damit auch der Versuch beendet werden muß.

1, 4, 8 oder 16 Spektren können auf dem Bildschirm gegeneinander versetzt sichtbar gemacht werden. Auf der Abbildung 2.2 ist die Veränderung des Methämoglobin-Spektrums während der Denaturierung mit H^+-Ionen auf diese Art mit acht Extinktionskurven übereinander dargestellt.

Beschreibung des Aufbaus und der Wirkungsweise des Rapidspektroskopes

Auf der Abbildung 2.3 sieht man ein Blockschaltbild des Photometers.

Als Lichtquelle dient eine Xenon-Hochdrucklampe der Type Osram XBO 450W/P mit stabilisierter Stromversorgung. Das Licht dieser Lampe wird mit Hilfe von zwei Spiegeln auf den Eintrittsspalt eines Gittermonochromators fokussiert. Je nach Wellenlängenbereich werden die Gitter 33-53-08-26 oder 33-53-08-01 der Firma Bausch und Lomb benutzt. Das Auflösungsvermögen des Gittermonochromators ist höchstens 0,5nm.

Ehe das Licht auf das Gitter fällt, wird es an einem planen Spiegel reflektiert. Dieser Spiegel kann auf elektromagnetischem Wege zu Schwingungen erregt werden. Er schwingt mit 50Hz um eine vertikale Achse. Das Spektrum wird dadurch 100-mal in der Sekunde über den Austritts-

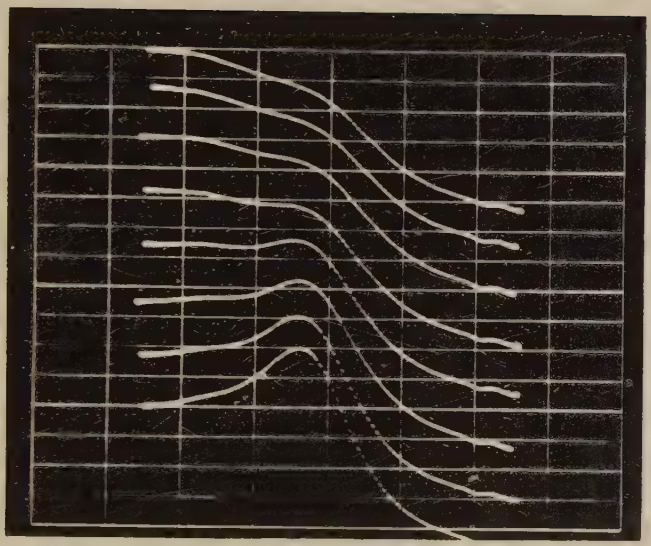


Abb.2.2. Mit dem Rapidspektrophotometer aufgenommene Spektren von Methämoglobin während der Denaturierung mit H^+-Ionen.

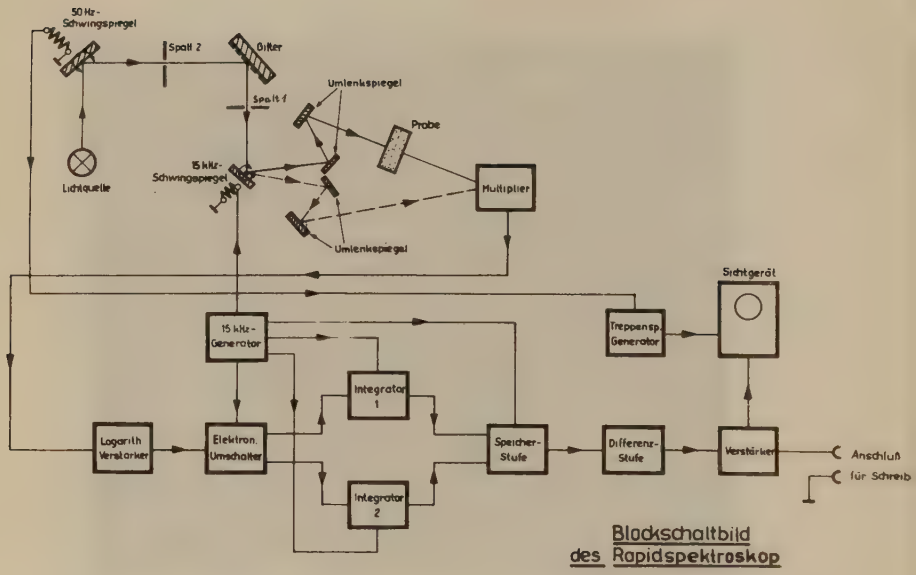


Abb.2.3. Blockschaltbild
des Rapidspektrophotometers
nach Lübbers und Niesel.

spalt des Monochromators bewegt. Durch das Hin- und Rückschwingen des Spiegels unterscheiden sich zwei aufeinander folgende Spektren durch ihre zeitliche Reihenfolge. Durch die Amplitude des Schwingspiegels kann man die absolute Größe des erfaßten Spektralbereiches um einen durch das Gitter zu wählenden Zentralwert regeln. Das Gitter ist drehbar gelagert. Es kann bei ruhig gestelltem Schwingspiegel zusätzlich zum Durchfahren des Spektrums benutzt werden. Durch einen Motorantrieb ist es möglich, Aufnahmefrequenzen von einem Hz und darunter zu bekommen. Diese langsameren Aufnahmefrequenzen dienen zum Aufzeichnen der Extinktionskurven mit einem Schreiber.

Ein zweiter planer Schwingspiegel schwingt mit 12 kHz beziehungsweise 25 kHz in den neueren Modellen, er ist 10mm^2 groß und stellt eine der charakteristischen Besonderheiten des Rapidspektrophotometers dar. Dieser Spiegel leitet das monochromatische Licht in einer optischen Brükke abwechselnd durch die Absorptionsprobe und eine Vergleichsprobe. Beide Strahlenbündel werden auf die gleiche Photokathode eines Sekundärelektronenvervielfachers als Empfänger geleitet. Vor dieser Photokathode befindet sich eine Ulbrichtsche Kugel, die das Licht möglichst diffus streut. Um möglichst geringe Lichtverluste zu haben, ist die Ulbrichtsche Kugel mit einer aufgedampften Schicht von Magnesiumoxyd belegt. Als Sekundärelektronenvervielfältiger wird der Typ 9558 QC der Firma E.M.I. verwendet. Das Quarzfenster des Multipliers garantiert die Durchlässigkeit für ultraviolettes Licht.

Die Spannungen aus dem Sekundärelektronenvervielfacher werden einem logarithmischen Verstärker zugeführt.

$$U_2 = \lg (U_1/U_o), \qquad (2.1)$$

$U_o \approx 1$ Volt,

U_1 die Eingangsspannung des Verstärkers,

U_2 die Ausgangsspannung des Verstärkers.

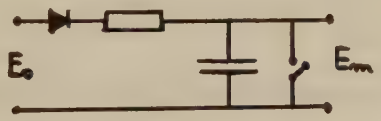
Die logarithmische Abhängigkeit stimmt bei unserem Photometer für die Eingangsspannung U_1 im Bereich von 1 bis 40 Volt bis auf einen Fehler von etwas weniger als 1%.

Die Spannungsimpulse des Meßkanals und des Vergleichskanals passieren abwechselnd mit der Frequenz des 12 beziehungsweise 25 kHz Schwingspiegels die Logarithmierstufe. Vor dem Eingang in die Logarithmierstufe werden die Signale des Meßkanals und des Vergleichskanals vorübergehend mittels eines elektronischen Schalters getrennt. Mit Hilfe von Potentiometern kann der Wert sowohl des Meßkanals als auch der Wert des Vergleichskanals um einen wählbaren Faktor r reduziert werden. ($0 \leqq r \leqq 1$) Diese Regelmöglichkeit ist wesentlich, da die Logarithmierstufe, wie oben erwähnt, nur im Bereich 1–40 Volt hinreichend genaue Werte liefert. Prinzipiell kann man das Gleiche erreichen, indem man im optischen Teil das Licht in dem betreffenden Kanal gleichmäßig für alle Wellenlängen abschwächt. Experimentell zeigte sich, daß die elektronische Signalreduzierung für unsere Messungen besser ist als die optischen Graufilter der Firma Schott. In der Reflexionsphotometrie erhielten wir relativ gute Ergebnisse mit graphitbeschichtetem Papier. Wegen der prinzipiell gleichen

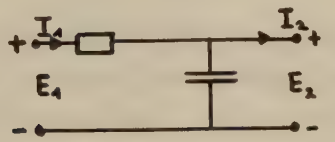
Wirkung der optischen Graufilter und der oben beschriebenen Impulsreduzierung reden wir im übertragenen Sinne von einem "elektronischen Graukeil".

Die durch die Logarithmierstufe umgewandelten Impulse werden durch einen elektronischen Schalter, der synchron mit dem 12 kHz-Spiegel arbeitet, nach Meß- und Vergleichskanal getrennt. Danach werden die Impulse je einem Integrator zugeführt.

Der Aufbau und die Dimensionierung dieser "Integrierglieder" sei etwas genauer erörtert.



Ist der Wert RC groß gegen die Impulsdauer, so ist die Wirkungsweise sofort zu übersehen — wir haben ein reines Integrierglied. Durch den folgenden Schalter kann der Kondensator wieder entladen werden und so für den nächsten Impuls bereit gemacht werden. Die vorgeschaltete Diode verhindert, daß die Spannung am Kondensator abnimmt.



Nach der Vierpolrechnung erhält man für die Kettenmatrix des RC-Gliedes

$$\begin{pmatrix} E_1 \\ I_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & R \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ pC & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_2 \\ I_2 \end{pmatrix}, \qquad (2.2)$$

p der zeitliche Differentialoperator,

$$\begin{pmatrix} E_1 \\ I_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 + pRC & R \\ pC & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_2 \\ I_2 \end{pmatrix}, \qquad (2.3)$$

$$E_1 = E_2 + pRCE_2 \quad \text{für } I_2 = 0\,, \qquad (2.4)$$

$$\frac{d}{dt} E_2(t) + \frac{1}{RC} E_2(t) = \frac{1}{RC} E_1(t). \qquad (2.5)$$

Die allgemeinste Lösung dieser linearen inhomogenen Differentialgleichung erster Ordnung lautet[103]

$$E_2(t) = e^{-\frac{t-\xi}{RC}} \left(\eta + \frac{1}{RC} \int_{\xi}^{t} e^{\frac{\tau}{RC}} E_1(\tau)\, d\tau \right). \qquad (2.6)$$

Diese Lösung enthält die allgemeine Anfangsbedingung

$$E_2(\xi) = \eta\,. \qquad (2.7)$$

Für unsere Fragestellung ist sinnvoll, anzunehmen

$$E_2(0) = 0\,. \qquad (2.8)$$

Die Spannung E_2 am Kondensator ist Null zur Zeit $t = 0$; denn vor der Ankunft eines neuen Impulses wird der Kondensator kurz geschlossen.

$$E_2(t) = \frac{1}{RC} e^{-t/RC} \int_{0}^{t} e^{\tau/RC} E_1(\tau)\, d\tau\,. \qquad (2.9)$$

Die Spannung E_m am Ausgang des RC-Gliedes, die dann als Wert für die weitere Signalverarbeitung benutzt wird, ist wegen der zwischengeschalteten Diode das Maximum der Spannung $E_2(t)$

$$E_m = \text{Max}\,(E_2(t)), \qquad (2.10)$$

$$E_m = \text{Max}\,(1/RC \cdot e^{-t/RC} \int_{0}^{t} e^{\tau/RC} \cdot E(\tau)\, d\tau)\,. \qquad (2.11)$$

Die beim Rapidspektrophotometer benutzten elektronischen Bausteine sind

$R = 600\ \Omega$, $C = 4{,}7\ nF$.

Damit ergibt sich für den Wert RC eine Größe von $2{,}8\ \mu s$.

Die Gesamtdauer T der Spannungsimpulse beträgt ca. $40\ \mu s$. Wir vergleichen die Zeit $T = 40\ \mu s$ mit dem RC-Wert von $2{,}8\ \mu s$. Es ist keineswegs $RC \gg T$, daher können wir im obigen Ausdruck für $E_2(t)$ die Exponentialfunktionen nicht näherungsweise 1 setzen. Dies wäre für ein reines Integrierglied richtig. Unsere derzeitige Auslegung entspricht mehr dem anderen Extremfall, daß $T \gg RC$, bei dem

$$E_2(t) \approx E_1(t) \qquad (2.12)$$

gilt. Das heißt, der als Meßwert benutzte Maximalwert entspricht der größten Impulshöhe. Die notwendige Bedingung für ein Maximum von $E_2(t)$ ist

$$\frac{d}{dt}\ E_2(t) = 0 \quad \text{für } t = t_m\ . \qquad (2.13)$$

Aus (2.9) erhalten wir

$$\frac{d}{dt}E_2(t) = \frac{1}{RC}\,E_1(t) - \frac{1}{(RC)^2}\,e^{-t/RC}\int_0^t e^{\tau/RC}\,E_1(\tau)\,d\tau\,. \qquad (2.14)$$

Mit (2.13) ergibt sich

$$E_1(t_m) = \frac{1}{RC}\,e^{-\frac{t_m}{RC}}\int_0^{t_m} e^{\frac{\tau}{RC}}\,E_1(\tau)\,d\tau\,. \qquad (2.15)$$

Der Kondensator wird so lange aufgeladen, bis die Spannung am Kondensator gleich der außen angelegten Spannung ist. Im Falle einer genauen numerischen Lösung dieses Problems würde man zweckmäßigerweise aus dieser Beziehung (2.15) den Wert t_m bestimmen.

Wir erhalten

$$E_m = E_2(t_m) = \text{Max}\,(E_2(t)) \qquad (2.16)$$

$$E_m = \frac{1}{RC}\, e^{-t_m/RC} \int_0^{t_m} e^{\tau/RC}\, E_1(\tau)\, d\tau, \qquad (2.17)$$

$$E_m = \frac{1}{RC} \int_0^{t_m} e^{\frac{\tau - t_m}{RC}}\, E_1(\tau)\, d\tau. \qquad (2.18)$$

Mit

$$x = t_m - \tau \qquad (2.19)$$

ergibt sich

$$E_m = \frac{1}{RC} \int_0^{t_m} e^{-\frac{x}{RC}}\, E_1(t_m - x)\, dx\,. \qquad (2.20)$$

Diese Formel zeigt übersichtlich, aus welchen Anteilen des Spannungsimpulses der Wert E_m gebildet wird. Die Umgebung von $E_1(t_m)$ für $t < t_m$ hat den größten Einfluß auf die Bildung des Wertes E_m. Frühere Werte werden nur mit der fallenden Extinktionsfunktion $e^{-x/RC}$ versehen berücksichtigt. Je kleiner der Wert RC gewählt wird, desto größer wird der Wert E_m, er nähert sich immer mehr der oberen Schranke dieses Wertes, nämlich der größten Impulshöhe. Es zeigte sich, daß man ein besonders günstiges Verhältnis zwischen Signal und Rauschen erhält, wenn der Wert von RC klein gegen die Impulsdauer T ist. Um das zu verstehen, betrachten wir den folgenden Ausdruck für die Lichtintensitäten

$$L(t) + R(t) = L_0(t)\, 10^{-E} \qquad (2.21)$$

$L_0(t)$ die Lichtintensität des ungeschwächten Lichtes,

L(t) die Lichtintensität des durch die Probe geschwächten Lichtes,

R(t) das Rauschsignal des Multipliers.

Logarithmiert man die Gleichung (2.21) , so erhält man

$$\lg (L(t) + R(t)) = \lg (L_o(t)) - E . \qquad (2.22)$$

Durch die Logarithmierung werden die Signale am Beginn und am Ende der Impulse durch das Rauschen sehr stark verfälscht; denn dann sind die Lichtintensitäten sehr gering, und der Logarithmus ist bekanntlich für das Argument Null singulär.

Integrieren wir (2.22) über die Impulsdauer von 0 bis T, so erhält man

$$\int_0^T \lg (L(t) + R(t))\, dt = \int_0^T \lg (L_o(t))dt - \int_0^T E\, dt. \qquad (2.23)$$

Da wir die kleinen Lichtintensitäten mit erfassen, wird das integrierte Ergebnis mit relativ großen Fehlern behaftet sein. Vergleicht man die linke Seite der Formel (2.23) mit einem Signal, bei dem $R(t) \equiv 0$ ist, so folgt, sobald Rauschen dabei ist, daß das Integral kleiner ausfällt, das Rauschen mittelt sich nicht heraus.

Zusammenfassend können wir sagen, daß das voll aufintegrierte Signal schlechter ist als ein Signal, in das nur die Maximalwerte der Impulse eingehen.

Die beste Lösung wäre nach unserer Auffassung, die Signale vor der Logarithmierstufe aufzuintegrieren; denn das ist der Rechenvorgang, in dem man das Rauschen weitgehend rausmittelt. Die Formel

$$L(t) + R(t) = L(t)_o 10^{-E} \qquad (2.21)$$

ergibt integriert

$$\int_0^T L(t)dt + \int_0^T R(t)dt = 10^{-E} \int_0^T L_o(t)dt . \qquad (2.24)$$

Der integrierte Wert sollte mit Hilfe einer elektronischen Haltestufe bis zum nächsten Wert gehalten werden. Die Integration vor der Logarithmierung dürfte besonders für die Messung im ultravioletten Licht eine wesentliche Verbesserung darstellen, denn im ultravioletten Licht fällt das Rauschen besonders stark ins Gewicht.

Die Ausgangsspannungen E_m der RC-Glieder des Vergleichs- und Meßkanals werden in elektronischen Speicherstufen für die Dauer eines Impulses gespeichert. Die Differenz der beiden Speicherstufen ist der Extinktionswert, den wir erfassen möchten. Dieser Wert kann sich nur sprunghaft am Ende eines jeden Halbzyklus ändern, wenn an einen der beiden Speicherstufen ein neues Signal anliegt. Der Meßwert ist somit eine Treppenfunktion mit 24000 Stufen beziehungsweise mit 50000 Stufen pro Sekunde in den neueren Modellen. Bei der Übernahme der Werte in den Speicher einer digitalen Rechenmaschine hat man die Meßwerte mit 24 beziehungsweise 50kHz abzufragen, wenn keine Information verloren gehen soll.

Zusammenfassend sei betont, daß es durch die Art der Differenzbildung nach jedem Halbzyklus des 12kHz (beziehungsweise 25kHz) Spiegels ein neuer Meßwert entsteht. Damit hat man für die weitere Auswertung eine Signalfrequenz von 24 beziehungsweise 50kHz. Die Meßspannung ist proportional der Differenz der Logarithmen der Multiplierimpulse, daher ist diese Spannung auch proportional der Extinktion des Lichtes in der Probe.

Zur weiteren Auswertung stehen verschiedene Möglichkeiten zur Auswahl. Man kann die Spektren auf einem Oszillographen sichtbar machen, sodann kann man die Oszillographenbilder fotographieren und mit Zirkel und Lineal vermessen. Beim langsamen Betrieb des Photometers ist es möglich, die Spektren mit einem Schreiber aufzunehmen. Die genauste, aber zweifellos auch aufwendigste, Methode ist die analog-digitale Wandlung der Meßwerte und die Übernahme dieser Werte in den Speicher einer digitalen Rechenmaschine.

Wesentlich für die Funktionsweise des Rapidspektrophotometers ist das Regelsystem, welches besonders die unterschiedlichen spektralen Lichtintensitäten der Xenon-Lampe und die Wellenlängenabhängigkeit der Photokathode ausgleicht.

Wir registrieren mit dem Photometer

$$w = \lg \left(\frac{U_1}{U_2} \right). \qquad (2.25)$$

Ändert sich die Lichtintensität, so ist dadurch sowohl der Meßwert wie der Vergleichswert betroffen. Beide Werte ändern sich um den gleichen Faktor. Da die Größe w von dem Quotienten U_1/U_2 abhängt, so hat ein gemeinsamer Faktor keinen Einfluß auf w. Daß diese Regelung nicht ausreicht, liegt an den Daten der Logarithmierstufe. Der Wert w wird, wie oben dargelegt, nicht durch Quotientenbildung und anschließende Logarithmierung gewonnen, sondern durch den mathematisch gleichwertigen Rechenvorgang

$$w = \lg U_1 - \lg U_2 . \qquad (2.26)$$

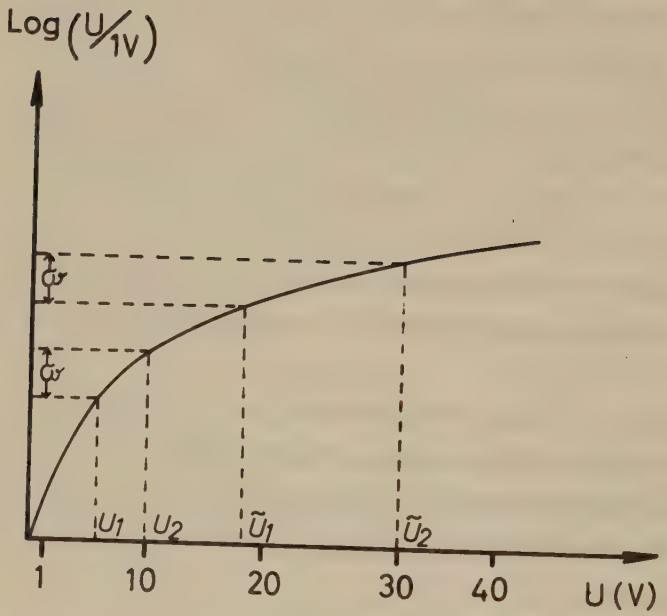


Abb.2.4. Kennlinie der Logarithmierstufe.
Ein konstanter Faktor bewirkt eine Verschiebung auf der Kennlinie: U_1, U_2 werden zu $\tilde{U}_1$, $\tilde{U}_2$. Es tritt dabei keine Änderung des Wertes w ein.

Die Abbildung 2.4 enthält die logarithmische Kennlinie der Logarithmierstufe. Nehmen wir zum Beispiel an, daß durch eine Helligkeitsänderung der Xenon-Lampe die Meßwerte U_1 und U_2 sich zu $\tilde{U}_1$ und $\tilde{U}_2$ ändern, so bedeutet dies eine Verschiebung auf der logarithmischen Kennlinie. Soll der Wert w sich möglichst wenig ändern, so stellt dies eine hohe Anforderung an die Genauigkeit der Logarithmierstufe dar. Trotz sorgfältiger Abgleichungen und Einbau weiterer Diodenstrecken gelang es uns nicht, den Fehler in der Logarithmierung über einen größeren Bereich wesentlich kleiner als 1% zu bekommen. Die auftretenden Fehler werden die unangenehme Eigenschaft haben, häufig ihr Vorzeichen zu wechseln, je nach Lage auf der logarithmischen Kennlinie. Wir machen von der Möglichkeit Gebrauch, die Fehler dadurch zu reduzieren, daß wir den Umfang der Logarithmierstufe klein halten, damit entfallen mehr Diodenstrecken auf einen entsprechenden Bereich. Dies ist keine echte Lösung, sondern nur eine Verlagerung des Problems. Für den unbeschränkten Einsatz der Logarithmierstufe zum Regeln sind die begrenzten Eingangswerte der Logarithmierstufe von 1 bis 40 Volt der Haupthinderungsgrund. Dieser Bereich, der 1,6 optischen Einheiten entspricht, sollte ganz als Meßumfang zur Verfügung stehen. Der Umfang der Logarithmierstufe mußte so klein gehalten werden, weil sonst die oben beschriebenen Fehler zu sehr ins Gewicht fallen.

Die Logarithmierstufe kann deshalb nur als zusätzliche Feinregelung benutzt werden. Das Wesentliche der Regelung

muß auf andere Weise bewirkt werden. Wir regeln mit Hilfe der Hochspannung des Sekundärelektronenvervielfachers. Die Regelgröße dieses Regelsystems ist die Höhe der Spannungsimpulse im Vergleichskanal. Der Sollwert kann von Hand an einem Regelverstärker eingestellt werden. Er darf 40 Volt nicht überschreiten, da, wie oben ausgeführt, die Logarithmierstufe nur bis zu diesen Spannungswerten richtige Ergebnisse liefert. Die Differenz zwischen Sollwert und Istwert der Impulshöhen im Vergleichskanal dient dazu, die Stellgrößen, nämlich die Hochspannung des Sekundäärelektronenvervielfachers, zu beeinflussen. Als Regelstrecke dient also der Multiplier. Auf der Abbildung 2.5 ist die Wirkung der Regelung dargestellt.

Die verstärkte Multiplierspannung ist als Funktion der Wellenlänge aufgetragen. Auf dem oberen Kurvenzug sehen wir die Wirkung der beschriebenen Regelung. Der untere Kurvenzug ist ohne Regelung, aber sonst unter den gleichen Versuchsbedingungen, erhalten worden. Die starken Schwankungen im Bereich von 470nm werden durch Emissionslinien der Xenon-Lampe hervorgerufen. Die Regelung hängt stark von der Bandbreite ab. Je mehr Meßpunkte für einen Spektralbereich zur Verfügung stehen, desto besser werden Schwankungen ausgeregelt. Am augenfälligsten ist dies an den Lampenlinien zu erkennen. Bei einem Gesamtaufnahmebereich von 100nm sind die Lampenlinien nur bei starker Vergrößerung auf dem Oszillographen noch zu erkennen.

Das Rapidspektrophotometer hat einen Meßumfang von 1,6O.E. bedingt durch die Daten der Logarithmierstufe. Die Skala

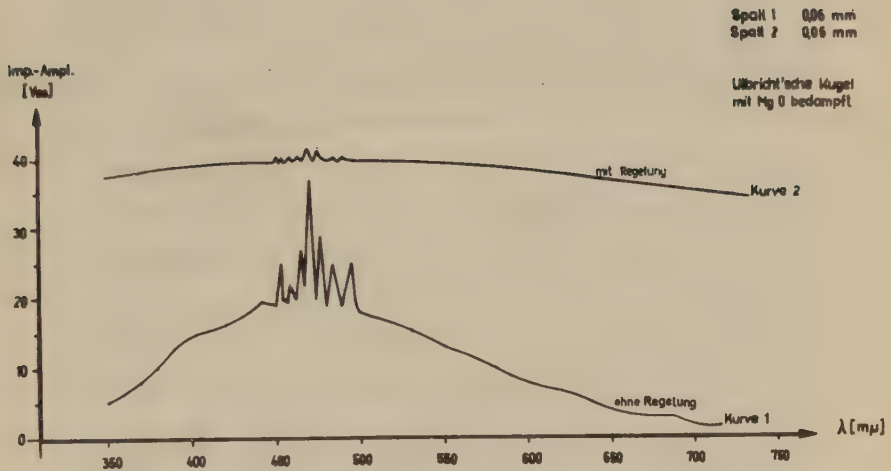


Abb.2.5. Diese Abbildung zeigt die Wirkung der Regelung mit Hilfe der Hochspannung des Sekundärelektronenvervielfachers.
Kurve 1 Nullinie ohne Regelung,
Kurve 2 Nullinie mit Regelung.

(siehe Abbildung 2.2) auf dem Oszillographenschirm ist von 0,01 bis 1,0 O.E. je Skalenteil wählbar. Man muß bei den Extinktionswerten mit Fehlern von ± 1 % des benutzten Extinktionsbereiches rechnen. Diese Fehler resultieren vorwiegend aus den Ungenauigkeiten der Logarithmierstufe. Dagegen kann man Extinktionsunterschiede bis zu 0,001 O.E. messen. Bei großen Spaltbreiten und gut transparenten Objekten ist diese Grenze durch nicht unterdrückte Reste der Schaltimpulse gegeben. Bei schwachen Lichtsignalen, seien sie durch die Spalte im Photometer oder auch die Objekte bedingt, ist das Rauschen des Multipliers eine weitere Fehlerquelle, die die Meßgenauigkeit beeinträchtigt. Das Rauschen des Multipliers nimmt an den Enden der Wellenlängenbereiche, also bei 230nm und 700nm, stark zu.

Zum Abschluß der Beschreibung des Rapidspektrophotometers führen wir noch einige, bislang nicht erwähnte, Daten über das Photometer an. Die Registrierung von 1; 3; 10; 30 oder 100 Spektren pro Sekunde ist möglich. Außerdem können wir durch Steuersignale die Aufnahme einzelner Spektren auslösen. Der zu erwartende Fehler in der Wellenlängeneinstellung beträgt etwa 1nm. Die Breite des Ein- und des Austrittsspaltes des Gittermonochromators läßt sich zwischen 0,6 und 0,06mm variieren. Je enger die Spalte gewählt werden, desto besser ist die Monochromasie des Lichtes, aber desto weniger Licht fällt auf die Probe, und desto mehr fällt das Rauschen des Sekundärelektronenvervielfachers ins Gewicht.

2.2. Die elektronische Rechenmaschine PDP8

Mit dem Rapidspektrophotometer fallen in der Sekunde 24 000 Meßwerte an. Wir haben das Ziel, die Auswertung während der Messung vorzunehmen, damit kein zusätzlicher Fehler durch die Meßwertspeicherung entsteht und vor allem, um eine Steuerung während der Reaktionen vornehmen zu können.

Zur Auswertung der Spektren des Rapidspektrophotometers wurde vom Institut für Angewandte Physiologie in Marburg der elektronische Kleinrechner PDP8 angeschafft. Es bestand die Aufgabe, den Rechner so weit auszubauen, daß man mit ihm das gesteckte Ziel möglichst weitgehend erreicht. Die anfallenden Probleme ließen sich mit einer größeren Datenverarbeitungsanlage relativ leicht lösen. Die Anschaffung einer solchen Anlage war von den Kosten her nicht vertretbar und nicht möglich. Es soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, wie weit es mit dem Kleinrechner PDP8 möglich ist, das gesteckte Ziel zu erreichen. Da so die zur Verfügung stehenden Möglichkeiten die Auswertverfahren weitgehend mitbestimmen, schien es uns angebracht, die wesentlichen Eigenschaften des elektronischen Rechners hier zu beschreiben.

Die Rechenmaschine PDP8 wird von der Firma Digital Equipment in den U.S.A. gebaut. Es ist ein kleiner relativ schneller Parallelrechner in Transistorbauweise.

Standardmäßig sind 4096 Worte vorhanden. Diese können auf Wunsch bis auf das Achtfache vermehrt werden.

Unsere Ausführung ist auf 8192 Worte erweitert worden. Ein derartiges Wort umfaßt 12 Bits. Es können jeweils 256 der Worte direkt adressiert werden, der Rest kann nur durch indirekte Adressierung in den Rechenprozeß einbezogen werden.

Die Zykluszeit des Rechners beträgt 1,5 μs. Eine erweiterte Arithmetik gestattet die Multiplikation von zwei 12 Bit Zahlen in weniger als 21,0 μs und die Division von entsprechenden Zahlen in weniger als 36,5 μs.

Die PDP8 bietet die Möglichkeit, Information aus 64 externen Kanälen aufzunehmen oder dorthin abzugeben. Für jeden derartigen Kanal stehen drei Befehle für die Programmierung zur Verfügung. Die Art der Befehle kann durch entsprechende Elektronik den speziellen Gegebenheiten der peripheren Geräte angepaßt werden. Ein peripheres Gerät entspricht häufig mehreren Informationskanälen.

Um Information von außen in den Rechner zu bringen, besteht der "Interrupt" Weg und die Möglichkeit des "Data Breaks". Der "Interrupt" benutzt das Rechenwerk, er muß vom Rechner durch ein Programm gesteuert werden. Die Daten gelangen in den Akkumulator und müssen von dort gegebenenfalls in den Kernspeicher weggespeichert werden.

Dieser Weg erfordert relativ viel Rechenzeit, günstiger ist für unser Problem die Möglichkeit des "Data Breaks". Es handelt sich um einen direkten Kernspeicherzugriff, der das laufende Programm nur 1,5 Mikrosekunden unterbricht und den Akkumulator des Rechners

nicht benutzt. Die Datenaufnahme kann, wie es bei uns nötig ist, von außen gesteuert werden. Die mit dem "Data-Break" übertragenen Werte stehen nach der Übertragung auf vorher festgelegten Plätzen im Kernspeicher. Das "Interface" des "Data-Breaks" wird von der Herstellerfirma nicht fertig geliefert. Es muß von dem Benutzer nach seinen speziellen Gegebenheiten selber zusammengebaut werden.

Ehe die Signale des Rapidspektrophotometers mit Hilfe des "Data-Breaks" oder auf dem "Interrupt-Weg" in den Kernspeicher des Rechners gelangen, müssen diese Signale normiert und digitalisiert werden. Je nach der speziellen Betriebsart des Analog-Digitalwandlers müssen die angebotenen Signalspannungen zwischen 0V und+10V oder zwischen -5V und +5V liegen. Diese Normierung machen wir mit einem dazwischengeschalteten Verstärker. Zur digitalen Erfassung benutzen wir den Analog-Digitalwandler 138 E der Firma Digital Equipment. Die Umwandlungszeit ist eine Funktion der einstellbaren Umwandlungsgenauigkeit. Man muß folgende Umwandlungszeiten in Kauf nehmen.

Wortlänge:	Umwandlungszeit:
8 Bit,	12,0 µs,
9 Bit,	13,5 µs,
10 Bit,	17.0 µs,
11 Bit,	25.0 µs,
12 Bit,	35.0 µs.

2.21. Periphere Geräte des Rechners PDP8

Die Standardein- und Standardausgabe der PDP8 ist die Teletype Fernschreibmaschine ASR-33. Sie ist mit einem Lochstreifenleser und einem Lochstreifenstanzer ausgerüstet. Neben diesem Lochstreifenleser, der mit der Geschwindigkeit von 10 Zeichen pro Sekunde den Streifen einliest, haben wir einen photoelektronischen schnellen Lochstreifenleser, der 300 Zeichen pro Sekunde liest. Der schnelle Lochstreifenstanzer stanzt 50 Zeichen je Sekunde. Für die Ausgabe stehen fünf Digital-Analogwandler zur Verfügung. Mit Hilfe dieser Digital-Analogwandler können errechnete Werte auf Schreiber ausgegeben werden. Zwei Digital-Analogwandler sind an einen Oszillographen angeschlossen. Diese Möglichkeit hat sich sehr bewährt, denn wir können damit Ergebnisse oder gemittelte und korrigierte Spektren sichtbar machen. Die Rechenanlage verfügt über zwei "Dectape"-Einheiten. Das "Dectape"-System ist ein Magnetbandsystem, das in unserer Ausbaustufe bis zu 6 Millionen Bits speichern kann. Die Zeichenübertragungsgeschwindigkeit vom Rechner auf das Band beträgt 15 kHz.

2.22. Die Programmierung auf dem Rechner PDP8

Zum Programmieren auf der PDP8 besteht die Möglichkeit, Programme in Fortran II zu schreiben.

Um mit einem in Fortran geschriebenen Programm rechnen zu können, muß das Programm in die Maschinensprache

übersetzt werden. Diese Übersetzung in das Maschinenprogramm ist nur mit dem Fortran-Arbeitssystem funktionsfähig; denn das Fortran-Arbeitssystem enthält die Unterprogramme für die möglicherweise benutzten Funktionen,wie den Sinus, den Cosinus, den Arcustangens, den Logarithmus, die Exponential- und die Wurzelfunktion. Um numerisch etwas aufwendigere Programme in Fortran zu rechnen, reichen die Speicherplätze vielfach nicht aus, da das Fortran-Arbeitssystem bereits 2700 von 4096 Speicherplätzen in Anspruch nimmt. Die Speicherplätze des zweiten Kernspeichers stehen nicht für das Fortranprogramm zur Verfügung. Es besteht die Möglichkeit, die Plätze des zweiten Kernspeichers über Unterprogramme in Maschinensprache zum Speichern von Daten zu benutzen. Die genaue Kenntnis des Fortran-Arbeitssystems erlaubt es, unbenutzte Teile dieses Programmes zu überspeichern. Die beschriebenen Auswege, um den für Fortran sehr beschränkten Speicherplatzvorrat zu erweitern, sind vielfach sehr mühsam und bedürfen umständlicher Programmierung. Wir waren trotzdem gezwungen, vielfach diesen Weg zu gehen.

Neben dem Programmieren in Fortran ist es möglich, Programme in maschineneigener Sprache zu erstellen. Dabei gibt die Herstellerfirma des Rechners verschiedene Programmierhilfen. An erster Stelle ist vielleicht der "Macro 8" Symbol-Übersetzer zu nennen. Dieser Übersetzer ermöglicht es, dem Rechner die Befehle nicht in Ziffernform,sondern in einem nemotechnisch günstigeren

Buchstabenschlüssel, zu geben.

Sieht man von der Teletype (ASR-33) mit ihren Möglichkeiten der Ein- und Ausgabe und vom schnellen Leser ab, so sind alle anderen peripheren Geräte nicht mit dem PDP8-Fortran ansprechbar. Will man die Geräte, wie zum Beispiel Analog-Digitalwandler, Digital-Analogwandler, Oszillographen, Schreiber oder den schnellen Stanzer, im Zusammenhang mit dem Rechner benutzen, so ist das nur über die maschineninterne Programmierung und durch Benutzung der entsprechenden Zwischenelektronik möglich. Die Sprache "Pal III", die auch vielfach zur Abfassung von Programmen für die PDP8 benutzt wird, unterscheidet sich nur geringfügig von der "Macro 8" Sprache.

Auch außerhalb vom Fortran hat man die Möglichkeit, die gängigen mathematischen Funktionen, wie den Sinus, den Cosinus, den Arcustangens, die Wurzelfunktion, den Logarithmus und die Exponentialfunktion, mit Hilfe von Unterprogrammen zu benutzen.

Eine große Hilfe bei der Programmierung der PDP8 sind die Korrekturprogramme, wie das "Debugging Programm" und der "Symbolic Tape Editor".

Die dieser Arbeit angefügten Programme sind in Fortran, in der "Macro 8" Sprache oder als kombinierte Fortran-Programme mit maschineninternen Unterprogrammen geschrieben.

Bei Programmen in der "Macro 8" Sprache muß man sich

allerdings stets klar machen, in welchen Speicherplätzen die Befehle nachher stehen sollen; denn sonst passiert es, daß verwendete Daten auf Kernspeicherplätzen stehen, die nicht mehr direkt adressierbar sind.

3.Kapitel

Die physikalischen Grundlagen der Lichtausbreitung in den biologischen Objekten

3.1. Theoretische Beschreibung der Lichtausbreitung in den Objekten

Man weiß, daß es sich beim Licht um einen elektromagnetischen Vorgang handelt. In makroskopischen Dimensionen genügen die elektromagnetischen Vorgänge den Maxwellschen Gleichungen. Die Maxwellschen Gleichungen lauten im Gaußschen c.g.s.-System[56]

$$\operatorname{rot} \mathfrak{E} = -\frac{1}{c}\frac{\partial \mathfrak{H}}{\partial t}\,, \tag{3.1}$$

$$\operatorname{rot} \mathfrak{H} = \frac{4\pi}{c}\mathfrak{j} + \frac{1}{c}\frac{\partial \mathfrak{D}}{\partial t}\,, \tag{3.2}$$

$$\operatorname{div} \mathfrak{D} = 4\pi\varrho\,, \tag{3.3}$$

$$\operatorname{div} \mathfrak{B} = 0\,. \tag{3.4}$$

Außerdem gelten die Materialgleichungen

$$\mathfrak{D} = \overleftrightarrow{\varepsilon}\,\mathfrak{E}\,, \tag{3.5}$$

$$\mathfrak{j} = \overleftrightarrow{\sigma}\,\mathfrak{E}\,, \tag{3.6}$$

$$\mathfrak{B} = \mu\,\mathfrak{H}\,. \tag{3.7}$$

$\overleftrightarrow{\varepsilon}$ ist der Dielektrizitätstensor und $\overleftrightarrow{\sigma}$ der Leitfähigkeitstensor. Die Materialkonstanten $\overleftrightarrow{\varepsilon}$, μ und $\overleftrightarrow{\sigma}$ sind reine Funktionen des Ortes. Sie beschreiben die zu untersuchenden Objekte. Es wird angenommen, daß

die Zeitabhängigkeit der Feldgrößen sich als Faktor

$$\exp(-i\omega t) \tag{3.8}$$

abseparieren läßt.[9,112] ω ist die Kreisfrequenz der eingestrahlten Wellen.

Statt des Ortsvektors r benutzen wir im folgenden den dimensionslosen Vektor

$$\zeta = \frac{\omega}{c} r. \tag{3.9}$$

Um kenntlich zu machen, daß nach den Komponenten des Vektors ζ differenziert wird, schreiben wir die Rotation in der Form

$$\frac{\partial}{\partial \zeta} \times . \tag{3.10}$$

Aus den Gleichungen (3.1) bis (3.8) erhalten wir

$$\frac{\partial}{\partial \zeta} \times \mathcal{E} = i \frac{\partial \mathcal{H}}{\partial t} , \tag{3.11}$$

$$\frac{\partial}{\partial \zeta} \times \mathcal{H} = -i \left(\frac{4\pi i \overleftrightarrow{\sigma}}{\omega} + \overleftrightarrow{\varepsilon} \right) \mathcal{E} . \tag{3.12}$$

Wir führen zur Abkürzung den Tensor

$$\overleftrightarrow{d} = \left(\frac{4\pi i \overleftrightarrow{\sigma}}{\omega} + \overleftrightarrow{\varepsilon} \right) \quad \text{ein.} \tag{3.13}$$

Damit lauten die Gleichungen (3.12)

$$\frac{\partial}{\partial \zeta} \times \mathcal{H} = -i \overleftrightarrow{d} \mathcal{E} . \tag{3.14}$$

Die Gleichungen (3.11) und (3.14) sind zusammen ein System von partiellen Differentialgleichungen erster Ordnung für die sechs unbekannten Funktionen $\mathcal{E}(\zeta)$ und $\mathcal{H}(\zeta)$.

3.11. Die Reduktion des Systems partieller Differentialgleichungen in ein System gewöhnlicher Differentialgleichungen

Wir benutzen ein Koordinatensystem s^1, s^2, s^3 mit dem metrischen Tensor $g_{\mu\nu}$.

Aus den Gleichungen (3.11), (3.14) ergibt sich[42]

$$\frac{1}{\sqrt{g}}\left(\frac{\partial}{\partial s^{\mu}} h_{\nu} - \frac{\partial}{\partial s^{\nu}} h_{\mu}\right) = -d^{\lambda k} e_k, \tag{3.15}$$

$$\frac{1}{\sqrt{g}}\left(\frac{\partial}{\partial s^{\mu}} e_{\nu} - \frac{\partial}{\partial s^{\nu}} e_{\mu}\right) = i h^{\lambda}, \tag{3.16}$$

(λ, μ, ν) zyklisch (1, 2, 3).

h_ν und e_ν sind die kovarianten Komponenten der Vektoren $\mathfrak{h}$ und $\mathfrak{E}$, während $d^{\lambda k}$ und h^{λ} die kontravarianten Komponenten der Größen $\overleftrightarrow{d}$ und ~~von~~ $\mathfrak{h}$ sind.

Wir beschränken uns auf Lösungen, die den Ansätzen

$$e_\nu(\vartheta) = u(s^1)v(s^2)e_\nu(s^3), \tag{3.17}$$

$$h_\nu(\vartheta) = u(s^1)v(s^2)h_\nu(s^3) \tag{3.18}$$

genügen. Außerdem wird angenommen, daß die Tensorkomponenten $d^{\lambda k}$ und $g_{\mu\nu}$ nur von s^3 abhängen.

Es handelt sich bei dieser Annahme um eine sehr starke Einschränkung der betrachteten Objekte und der verwendeten Form der eingestrahlten Wellen.

Wenn wir annehmen, daß unsere Objekte horizontal geschichtet sind, sind diese Bedingungen auch für schräg einfallendes Licht erfüllt.

Wir betrachten ein kartesisches Koordinatensystem mit

der s^3-Achse in Richtung der Schichtung. Schickt man ebene Wellen, die auch schräg zur Schichtung laufen können, in ein horizontal geschichtetes Medium, so werden aus Symmetriegründen nur ebene Wellen aus dem Medium herauskommen. Eine Summe ebener Wellen genügt dem Ansatz

$$e_\nu = \exp\left\{i\int_a^{s^1} p\, d\tilde{s}^1\right\} \exp\left\{i\int_a^{s^2} q\, d\tilde{s}^2\right\} e_\nu(s^3), \quad (3.19)$$

$$h_\nu = \exp\left\{i\int_a^{s^1} p\, d\tilde{s}^1\right\} \exp\left\{i\int_a^{s^2} q\, d\tilde{s}^2\right\} h_\nu(s^3). \quad (3.20)$$

Alle einschränkenden Voraussetzungen, die gemacht wurden, sind damit erfüllt. Die Ansätze (3.17) und (3.18) führen zu keinen Widersprüchen in den aus den Maxwellschen Gleichungen gewonnenen Gleichungssystemen (3.15) und (3.16), wenn man die Funktionen $u(s^1)$ und $v(s^2)$ geeignet wählt. Aus (3.15) folgen mit den Ansätzen (3.17) und (3.18) die Beziehungen

$$\frac{v'(s^2)}{v(s^2)} - \frac{h_2'(s^3)}{h_3(s^3)} = -i\sqrt{g(s^3)}\sum_{k=1}^{3} d^{1k}(s^3)\,\frac{e_k(s^3)}{h_3(s^3)}\,, \quad (3.21)$$

$$\frac{h_1'(s^3)}{h_3(s^3)} - \frac{u'(s^1)}{u(s^1)} = -i\sqrt{g(s^3)}\sum_{k=1}^{3} d^{2k}(s^3)\frac{e_k(s^3)}{h_3(s^3)}, \quad (3.22)$$

$$\frac{u'(s^1)}{u(s^1)}h_2(s^3) - \frac{v'(s^2)}{v(s^2)}h_1(s^3) = -i\sqrt{g(s^3)}\sum_{k=1}^{3} d^{2k}(s^3)e_k(s^3). \quad (3.23)$$

Entsprechend folgen aus (3.16) die Gleichungen

$$\frac{v'(s^2)}{v(s^2)} - \frac{e_2'(s^3)}{e_3(s^3)} = i\sqrt{g(s^3)}\,\frac{h^1(s^3)}{e_3(s^3)}\,, \quad (3.24)$$

$$\frac{e_1'(s^3)}{e_3(s^3)} - \frac{u'(s^1)}{u(s^1)} = i\sqrt{g(s^3)}\,\frac{h^2(s^3)}{e_3(s^3)}\,, \tag{3.25}$$

$$\frac{u'(s^1)}{u(s^1)}\,e_2(s^3) - \frac{v'(s^2)}{v(s^2)}\,e_1(s^3) = i\sqrt{g(s^3)}\;h^3(s^3). \tag{3.26}$$

Die Gleichungen (3.21) - (3.26) sind nur dann widerspruchsfrei, wenn

$$\frac{u'(s^1)}{u(s^1)} = i\,p = \text{konst} \tag{3.27a}$$

und

$$\frac{v'(s^2)}{v(s^2)} = i\,q = \text{konst} \tag{3.27b}$$

ist.

Integriert man die Gleichungen (3.27), so erhält man

$$u(s^1) = \text{konst.}\,\exp(i\,p\,s^1) \tag{3.28a}$$

und

$$v(s^2) = \text{konst.}\,\exp(i\,q\,s^2)\,. \tag{3.28b}$$

Mit den Beziehungen (3.27) ergeben sich aus den Gleichungen (3.21) - (3.26)

$$\frac{dh_2}{ds} = i\,q\,h_3 + i\sqrt{g}\sum_{k=1}^{3} d^{1k}e_k\,, \tag{3.29}$$

$$\frac{dh_1}{ds} = i\,p\,h_3 - i\sqrt{g}\sum_{k=1}^{3} d^{2k}\,e_k\,, \tag{3.30}$$

$$i\,p\,h_2 - i\,q\,h_1 = -i\sqrt{g}\sum_{k=1}^{3} d^{3k}\,e_k\,, \tag{3.31}$$

$$\frac{de_2}{ds} = -i \sqrt{\frac{g_{22}g_{33}}{g_{11}}}\, h_1 + i q e_3 , \tag{3.32}$$

$$\frac{de_1}{ds} = i \sqrt{\frac{g_{11}g_{33}}{g_{22}}}\, h_2 + i p e_3 , \tag{3.33}$$

$$i p e_2 - i q e_1 = i \sqrt{\frac{g_{11}g_{22}}{g_{33}}}\, h_3 . \tag{3.34}$$

Zur Abkürzung wurde s statt s^3 geschrieben.

Das Gleichungssystem (3.29-3.34) lautet in Matrizenform

$$\frac{d}{ds}\begin{pmatrix} e_1 \\ e_2 \\ 0 \\ h_2 \\ -h_1 \\ 0 \end{pmatrix} = i \begin{pmatrix} 0 & 0 & p & \frac{\sqrt{g}}{g_{22}} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & q & 0 & \frac{\sqrt{g}}{g_{11}} & 0 \\ q & -q & 0 & 0 & 0 & \frac{\sqrt{g}}{g_{33}} \\ \sqrt{g}d^{11} & \sqrt{g}d^{12} & \sqrt{g}d^{13} & 0 & 0 & q \\ \sqrt{g}d^{21} & \sqrt{g}d^{22} & \sqrt{g}d^{23} & 0 & 0 & -p_1 \\ \sqrt{g}d^{31} & \sqrt{g}d^{32} & \sqrt{g}d^{33} & p & q & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} e_1 \\ e_2 \\ e_3 \\ h_2 \\ -h_1 \\ h_3 \end{pmatrix} . \tag{3.35}$$

Da nur die Ableitungen von e_1, h_2, e_2 und h_1 vorkommen, läßt sich das System auf vier Differentialgleichungen erster Ordnung reduzieren. Dieses System aus vier linearen Differentialgleichungen schreiben wir in Matrixform

$$\underline{y}'(s) = T(s)\, \underline{y}(s) . \tag{3.36}$$

Dabei ist

$$\underline{y}(s) = \begin{pmatrix} e_1(s) \\ e_2(s) \\ h_2(s) \\ -h_1(s) \end{pmatrix} \quad \text{und} \tag{3.37}$$

T(s) eine 4x4 Matrix.

Kennt man Lösungen des Gleichungssystems (3.36), so kennt man Lösungen der Maxwellschen Gleichungen. Man hat in dem betreffenden Medium eine mögliche Lichtausbreitung gefunden. Wir wollen dieses Differentialgleichungssystem aus vier gekoppelten Differentialgleichungen so transformieren, daß es für konstantes T aus entkoppelten Differentialgleichungen besteht. Wir möchten nicht die elektrischen und magnetischen Feldgrößen als unbekannte Funktionen in unserem Differentialgleichungssystem haben. Diese Feldgrößen e_ν und h_ν sind auch im homogenen Medium stark miteinander verkoppelt, wie die Maxwellschen Gleichungen zeigen. Unser Ziel besteht darin, die Amplituden von Lichtwellen als unbekannte Funktionen zu haben, die sich möglichst ungestört voneinander fortpflanzen.

Dazu führen wir mit Hilfe der Transformationsmatrix V(s) das neue Funktionensystem

$$\underline{g}(s) = \begin{pmatrix} g_1(s) \\ g_2(s) \\ g_3(s) \\ g_4(s) \end{pmatrix} = V^{-1}(s)\,\underline{y}(s) \qquad (3.38)$$

ein. Multiplizieren wir die Gleichung (3.36) mit $V^{-1}(s)$, so erhalten wir

$$V^{-1}(s)\,\underline{y}'(s) = V^{-1}(s)T(s)V(s)V^{-1}(s)\,\underline{y}(s)\,. \qquad (3.39)$$

Setzen wir zur Abkürzung

$$P(s) = V^{-1}(s)T(s)V(s), \qquad (3.40)$$

so folgt

$$\underline{g}'(s) = P(s)\,\underline{g}(s) + V^{-1\prime}(s)\,V(s)\,\underline{g}(s)\,. \qquad (3.41)$$

Setzt man

$$V^{-1\prime}(s)\,V(s) = W(s)\,, \qquad (3.42)$$

so ergibt sich für das zu behandelnde Differentialgleichungssystem

$$\underline{g}'(s) = P(s)\,\underline{g}(s) + W(s)\,\underline{g}(s)\,. \qquad (3.43)$$

Wir beschränken uns auf den Fall, daß die Matrix $T(s)$ vier linear unabhängige Eigenvektoren

$$\underline{t}_1(s),\ \underline{t}_2(s),\ \underline{t}_3(s),\ \underline{t}_4(s) \qquad (3.44)$$

besitzt.

Wir wählen als Transformationsmatrix $V(s)$ die Matrix, die die vier Eigenvektoren $\underline{t}_i(s)$ als Spalten enthält. Damit hat man für ein homogenes Medium ein entkoppeltes Gleichungssystem gefunden; denn mit diesem $V(s)$ liefert die Ähnlichkeitstransformation

$$P(s) = V^{-1}(s)\,T(s)\,V(s) \qquad [3.40]$$

eine Diagonalmatrix. Die Eigenvektoren (3.44) sind nur bis auf eine Funktion als Faktor bestimmt. Diese Faktoren kann man so wählen, daß die Matrix

$$W(s) = V^{-1\prime}(s)\,V(s) = -V^{-1}(s)\,V'(s) \qquad (3.45)$$

in der Hauptdiagonalen Nullen enthält.

Das Gleichungssystem

$$\underline{g}'(s) = (P(s) + W(s))\,\underline{g}(s) \qquad [3.43]$$

läßt sich teilweise integrieren. Wir machen den Ansatz

$$\underline{h}(s) = \bar{A}(s)\,\underline{g}(s) \quad . \tag{3.46}$$

Die Diagonalmatrix A(s) sei Lösung des Differentialgleichungssystems

$$A'(s) = +P(s)\,A(s). \tag{3.47}$$

Dieses System ist ohne weiteres lösbar, da auch P(s) eine Diagonalmatrix ist. Mit (3.46) erhalten wir

$$\underline{h}'(s) = A^{-1}(s)\,W(s)\,A(s)\,\underline{h}(s) \quad . \tag{3.48}$$

Mit

$$Q(s) = A^{-1}(s)\,W(s)\,A(s) \tag{3.49}$$

erhalten wir

$$\underline{h}'(s) = Q(s)\,\underline{h}(s) \quad . \tag{3.50}$$

Im homogenen Medium ist $Q \equiv 0$, so daß wir als Lösung

$$\underline{h}(s) = \text{const} \tag{3.51}$$

erhalten. Nur bei inhomogenen Objekten besteht eine Kopplung der einzelnen Komponenten von h(s). Wir bezeichnen das Gleichungsesystem (3.50) deshalb im folgenden als das für homogene Medien entkoppelte Gleichungssystem.

3.12. Die Lösung des Differentialgleichungssystems mit Hilfe des Matrizantenformalismus

Mit Hilfe des Matrizantenformalismus[26,118,119] sind wir in der Lage, auf übersichtliche Weise Näherungslösungen des Differentialgleichungssystems (3.50) anzugeben. Diese Näherungslösungen eignen sich besonders gut zur Beschreibung von Reflexionsvorgängen bei der Wellenaus-

breitung in inhomogenen Medien. Wir können eine Entwicklung nach der Zahl der Streuvorgänge angeben.

Wir betrachten das Differentialgleichungssystem

$$\underline{h}'(s) = Q(s)\,\underline{h}(s) \,, \qquad [3.50]$$

welches näherungsweise die Lichtausbreitung in unseren Objekten beschreibt.

Zur Erklärung des Matrizanten nehmen wir an, wir hätten vier linear unabhängige Lösungsvektoren

$$h_1(s),\ h_2(s),\ h_3(s),\ h_4(s) \qquad (3.52)$$

gefunden. Wir bilden die Wronskimatrix

$$H(s) = (h_1(s),\ h_2(s),\ h_3(s),\ h_4(s)) \,. \qquad (3.53)$$

Den Matrizanten erhält man aus dieser Matrix durch die Rechenvorschrift

$$M(s,\ s_a) = H(s)\ H^{-1}(s_a) \,. \qquad (3.54)$$

$H^{-1}(s_a)$ ist die inverse Matrix zu der Matrix $H(s_a)$.

Der Matrizant ist eine speziell normierte Wronskimatrix. Durch die Konstruktionsvorschrift (3.54) ist der Matrizant stets so normiert, daß

$$M(s, s) = E \qquad (3.55)$$

gilt. Der Matrizant von gleichen Argumenten ist stets die Einheitsmatrix E. Die Spalten des Matrizanten sind Lösungen des Gleichungssystems (3.50), daher gilt

$$\frac{d}{ds}\, M(s,\ s_a) = Q(s)\ M(s,\ s_a) \,. \qquad (3.56)$$

Dies ist die Differentialgleichung des Matrizanten. Der Matrizant hat ferner die sehr wesentliche Eigenschaft,

daß die folgende Produktformel gilt

$$M(s, s_a) = M(s, s_b)\ M(s_b, s_a)\,. \qquad (3.57)$$

Ist es uns gelungen, zum Beispiel in unseren biologischen Objekten die Lichtausbreitung in verschiedenen Teilgebieten mit Hilfe des Matrizanten zu beschreiben, so liefert das Matrizantenprodukt die Lösung im Gesamtbereich. Ist das Medium gleichartig längs einer dickeren Schicht beschaffen, so kann man aus dem Reflexions- und Durchlaßverhalten an dünnen Schichten auf die Eigenschaften dickerer Proben schließen. Die Produktformel (3.57) des Matrizanten gibt uns die Möglichkeit dazu.

Aus dem Differentialgleichungssystem des Matrizanten (3.56) und unter Benutzung der Normierung (3.55) erhält man die folgende Integralgleichung

$$M(s, s_a) = E + \int_{s_a}^{s} Q(r)\, M(r, s_a)\, dr \qquad (3.58)$$

für den Matrizanten. E ist die Einheitsmatrix.

Die Neumannsche Reihe[92] dieser Integralgleichung lautet

$$M(s, s_a) = E + \int_{s_a}^{s} Q(r)\, dr + \int_{s_a}^{s} Q(r) dr \int_{s_a}^{r} Q(u)\, du \ldots \qquad (3.59)$$

oder

$$M(s, s_a) = E + \sum_{n=1}^{\infty} \int_{s_a}^{s} Q_n(r)\, dr\,, \qquad (3.60)$$

$$Q_1(u) = Q(u)\,, \qquad (3.61)$$

$$Q_n(u) = Q(u) \int_{s_a}^{u} Q_{n-1}(r)\, dr\,. \qquad (3.62)$$

Diese Darstellung des Matrizanten hat eine sehr anschauliche physikalische Bedeutung. Das erste Glied beschreibt die nur durch Absorption geschwächten sonst unbehindert durchlaufenden Wellen. Das zweite Glied berücksichtigt außer der Absorption, daß ein Teil der Wellen in eine andere Form übergeht. Die Wellen werden reflektiert oder ändern ihre Polarisation . Das dritte Glied berücksichtigt neben der Absorption, daß die reflektierten oder in ihrer Polarisation geänderten Lichtwellen ihrerseits wieder reflektiert oder in ihrer Polarisation geändert werden können. Die weiteren Summanden haben entsprechende Bedeutung. Nicht zuletzt wegen der physikalischen Bedeutung der Summanden der Formel (3.59) ist dieser Formalismus so geeignet zur Beschreibung der Lichtausbreitung in unseren Objekten.

Aus (3.55), (3.56) und (3.57) erhält man die Beziehung

$$\underline{h}(s) = M(s, s_a)\, \underline{h}(s_a) \,. \qquad (3.63)$$

Der Lösungsvektor $\underline{h}(s_a)$ für das Argument s_a wird durch den Matrizanten $M(s, s_a)$ auf den Lösungsvektor mit dem Argument s abgebildet.

Für die späteren Rechnungen benötigen wir die Transformation des Matrizanten beim Übergang zu einem neuen Funktionensystem. $N(s, s_a)$ sei der Matrizant des linearen Differentialgleichungssystems

$$\underline{y}'(s) = T(s)\, \underline{y}(s) \,. \qquad [3.36]$$

Entsprechend sei $\hat{N}(s, s_a)$ der Matrizant des Gleichungssystems

$$\hat{\underline{y}}'(s) = \hat{T}(s)\,\hat{\underline{y}}(s) \quad . \tag{3.64}$$

Besteht zwischen $\underline{y}(s)$ und $\hat{\underline{y}}(s)$ der Zusammenhang

$$\underline{y}(s) = L(s)\,\hat{\underline{y}}(s) \quad , \tag{3.65}$$

so folgt

$$\underline{y}(s) = L(s)\,\hat{N}(s, s_a)\,\hat{\underline{y}}(s_a) \quad , \tag{3.66}$$

$$\underline{y}(s) = L(s)\,\hat{N}(s, s_a)L^{-1}(s_a)\,\underline{y}(s_a) \quad . \tag{3.67}$$

Andererseits gilt

$$\underline{y}(s) = N(s, s_a)\,\underline{y}(s_a) \quad . \tag{3.63}$$

Damit erhält man

$$N(s, s_a) = L(s)\,\hat{N}(s,s_a)\,L^{-1}(s_a) \tag{3.68}$$

oder

$$\hat{N}(s,s_a) = L^{-1}(s)\,N(s,s_a)\,L(s_a) \quad . \tag{3.69}$$

3.13. Die Übertragungsmatrix der Lichtausbreitung

In diesem Abschnitt soll gezeigt werden, wie sich mit Hilfe des Matrizantenformalismus die Reflexion-, Durchlaß- und Konversionskoeffizienten der "charakteristischen Wellen" $\underline{g}(s)$[112] ergeben.

Der Übergang vom Gleichungssystem

$$\underline{y}'(s) = T(s)\,\underline{y}(s) \tag{3.36}$$

zum Gleichungsysytem der "charakteristischen Wellen" $\underline{g}(s)$

$$\underline{g}'(s) = \big(P(s) + W(s)\big)\,\underline{g}(s) \tag{3.43}$$

erfolge so, daß an den Rändern des Objektes die Wellen

folgendermaßen in hinein- und herauslaufende Wellen getrennt sind. Am unteren Rand s_a laufen die sich durch die Polarisationsrichtungen unterscheidenden Wellen $g_1(s_a)$ und $g_2(s_a)$ in das zu untersuchende Medium hinein. Die Wellen $g_3(s_a)$ und $g_4(s_a)$ verlassen am unteren Rand das Objekt. Am oberen Rand s_b verlassen die Wellen $g_1(s_b)$ und $g_2(s_b)$ das Objekt. Die Wellen $g_3(s_b)$ und $g_4(s_b)$ treten in das zu untersuchende Medium ein. Diese Festlegung ist durch entsprechende Anordnung der Eigenvektoren (3.44) in der Transformationsmatrix V(s) möglich.

Den Matrizanten von (3.43) bezeichnen wir als

$$G(s,s_a) \; . \tag{3.70}$$

In Analogie zu (3.63) gilt

$$\underline{g}(s) = G(s,s_a)\,\underline{g}(s_a) \; . \tag{3.71}$$

Ausgeschrieben ergibt diese Beziehung für $s = s_b$ die Beziehung

$$\begin{pmatrix} g_1(s_b) \\ g_2(s_b) \\ g_3(s_b) \\ g_4(s_b) \end{pmatrix} = G(s_b,s_a) \begin{pmatrix} g_1(s_a) \\ g_2(s_a) \\ g_3(s_a) \\ g_4(s_a) \end{pmatrix} . \tag{3.72}$$

Die Matrix $G(s_b,s_a)$ vermittelt den Zusammenhang zwischen den Wellen, die bei s_a in das Medium hinein- und herausgehen, und den Wellen, die bei s_b in das Medium hinein- und herausgehen. Wir bezeichnen die Matrix $G(s_b,s_a)$ in Analogie zu den Bezeichnungen in [118,119] als Übertragungsmatrix.

Aus (3.38) erhalten wir mit (3.69) die Beziehung

$$G(s_b,s_a) = V^{-1}(s_b)\, N(s_b,s_a)\, V(s_a) \,. \qquad (3.73)$$

Diese Beziehung beschreibt den Zusammenhang zwischen dem Matrizanten $N(s_b,s_a)$ des Gleichungssystems (3.36) und der Übertragungsmatrix.

3.14. Die Streumatrix der Lichtausbreitung

Wir fassen,um Schreibarbeit zu sparen, die beiden Wellentypen, die sich nur durch die Polarisationsrichtung unterscheiden, zusammen. Es sind

$$\underline{g_{12}}(s) = \begin{pmatrix} g_1(s) \\ g_2(s) \end{pmatrix} \qquad (3.74)$$

die in der einen Richtung laufenden Wellen und

$$\underline{g_{34}}(s) = \begin{pmatrix} g_3(s) \\ g_4(s) \end{pmatrix} \qquad (3.75)$$

die in der anderen Richtung laufenden Wellen. Die Übertragungsmatrix $G(s_b,s_a)$ schreiben wir in den folgenden Teilmatrizen

$$\begin{pmatrix} \underline{g_{12}}(s_b) \\ \underline{g_{34}}(s_b) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} G_I(s_b,s_a) & G_{II}(s_b,s_a) \\ G_{III}(s_b,s_a) & G_{IV}(s_b,s_a) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \underline{g_{12}}(s_a) \\ \underline{g_{34}}(s_a) \end{pmatrix}. \qquad (3.76)$$

Wir ordnen das Gleichungssystem wie folgt um

$$\begin{pmatrix} \underline{g_{12}}(s_b) \\ \underline{g_{34}}(s_a) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} S_I & S_{II} \\ S_{III} & S_{IV} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \underline{g_{34}}(s_b) \\ \underline{g_{12}}(s_a) \end{pmatrix} \quad (3.77).$$

Der auf der rechten Seite stehende Ausdruck

$$\begin{pmatrix} \underline{g_{34}}(s_b) \\ \underline{g_{12}}(s_a) \end{pmatrix} \quad (3.78)$$

beschreibt die in das Medium hineinlaufenden Wellen. Der auf der linken Seite stehende Ausdruck

$$\begin{pmatrix} \underline{g_{12}}(s_b) \\ \underline{g_{34}}(s_a) \end{pmatrix} \quad (3.79)$$

beschreibt die aus dem Medium herauskommenden Wellen. Die Matrix

$$S = \begin{pmatrix} S_I & S_{II} \\ S_{III} & S_{IV} \end{pmatrix} \quad (3.80)$$

bezeichnen wir in Analogie zu der Literatur [118,119] als Streumatrix. Die Streumatrix verknüpft die in das Medium hineinlaufenden Wellen mit den aus den Objekten herauslaufenden Wellen. Die Glieder

$$S_{kk} \quad (3.81)$$

in der Hauptdiagonalen der Streumatrix sind die Reflexionskoeffizienten der verschiedenen Wellenarten. Diese Reflexionskoeffizienten sind definiert als das Verhältnis der hinein- und der entsprechenden herauslaufenden Wellen am Rand des Mediums. Die Elemente der Hauptdiagonalen der Untermatrizen

S_{II}

und (3.82)

S_{III}

sind die Durchlaßkoeffizienten für die einzelnen Wellenarten. Die restlichen Elemente der Streumatrix sind die übrigen Konversionskoeffizienten von einer Wellenart zur anderen.

Aus dem Vergleich von (3.76) und (3.77) erhält man für die Streumatrix

$$S = \begin{pmatrix} G_{\underline{II}}(s_b,s_a)G^{-1}_{\underline{IV}}(s_b,s_a); & G_{\underline{I}}(s_b,s_a)-G_{\underline{II}}(s_b,s_a)G^{-1}_{\underline{IV}}(s_b,s_a)G_{\underline{III}}(s_b,s_a) \\ G^{-1}_{\underline{IV}}(s_b,s_a); & -G^{-1}_{\underline{IV}}(s_b,s_a)G_{\underline{III}}(s_b,s_a) \end{pmatrix}. \tag{3.83}$$

Mit Hilfe dieser Formel läßt sich aus der Übertragungsmatrix $G(s_b,s_a)$ die Streumatrix S berechnen.

3.15. Die Anwendung der beschriebenen Theorie

Es sollen die Übertragungsmatrix $G(s_b,s_a)$ und die Streumatrix S für unsere biologischen Objekte näherungsweise berechnet werden.

Wie oben beschrieben, ist die Übertragungsmatrix $G(s_b,s_a)$ ein Matrizant, den man nach (3.57) aus den Matrizanten der Teilgebiete berechnen kann. Wir erhalten

$$G(s_b,s_a) = G(s_b,s_c)\, G(s_c,s_d)\, G(s_d,s_a) . \tag{3.84}$$

Fällt das Licht auf die Objektoberfläche, sei es eine

Organoberfläche oder eine Küvette, so erhalten wir Reflexion durch den Brechungsindexgradienten. Diese reguläre oder Spiegelreflexion ist keineswegs zu vernachlässigen. So beträgt die Reflexion am Übergang Vakuum-Glas ($n = 1{,}5$) bei senkrechtem Einfall 4%. Dies ergibt sich aus den in der Theorie der Optik behandelten Fresnelschen Formeln.[6,104]

Der hier beschriebene Formalismus gibt die Möglichkeit, die Fresnelschen Formeln auf abstrakte Weise herzuleiten.

Die Matrizanten

$$G(s_b, s_c)$$

und

$$G(s_d, s_a)$$

beschreiben die Lichtausbreitungen an den Grenzen des Objektes. Diese Anteile sollen hier nicht weiter diskutiert werden.

Um die Matrix

$$G(s_c, s_d)$$

zu berechnen, betrachten wir das Gleichungssystem

$$\underline{g}'(s) = \Big(P(s) + W(s)\Big)\, \underline{g}(s) \,. \qquad [3.43]$$

$P(s)$ ist eine Diagonalmatrix. Sie enthält in der Diagonalen die Eigenwerte

$$i\, z_\nu(s) \,, \quad \nu = 1, .., 4, \qquad (3.85)$$

der Matrix $T(s)$. In Matrizenform geschrieben erhalten wir

$$P(s) = \begin{pmatrix} iz_1(s) & 0 & 0 & 0 \\ 0 & iz_2(s) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & iz_3(s) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & iz_4(s) \end{pmatrix}. \qquad (3.86)$$

Wir lösen das Differentialgleichungssystem

$$A'(s) = P(s)\, A(s) \qquad [3.47]$$

und erhalten

$$A(s) = \begin{pmatrix} \exp\left\{i\int_{s_0}^{s} z_1(\tilde{s})d\tilde{s}\right\} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \exp\left\{i\int_{s_0}^{s} z_2(\tilde{s})d\tilde{s}\right\} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \exp\left\{i\int_{s_0}^{s} z_3(\tilde{s})d\tilde{s}\right\} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \exp\left\{i\int_{s_0}^{s} z_4(\tilde{s})d\tilde{s}\right\} \end{pmatrix}. \qquad (3.87)$$

Als nächstes berechnen wir die Matrix Q(s), die als

$$Q(s) = A^{-1}(s)\, W(s)\, A(s) \qquad [3.49]$$

definiert wurde. Die Kopplungsmatrix W(s) hat,wie oben erläutert, das folgende Aussehen

$$W(s) = \begin{pmatrix} 0 & W_{12}(s) & W_{13}(s) & W_{14}(s) \\ W_{21}(s) & 0 & W_{23}(s) & W_{24}(s) \\ W_{31}(s) & W_{32}(s) & 0 & W_{34}(s) \\ W_{41}(s) & W_{42}(s) & W_{43}(s) & 0 \end{pmatrix}. \qquad (3.88)$$

Für die Elemente

$$Q_{ik}(s)$$

der Matrix Q(s) erhalten wir aus (3.49) und (3.87) die Beziehung

$$Q_{ik} = W_{ik}(s) \exp i\int_{s_o}^{s} (z_k(u)-z_i(u))du \ . \qquad (3.89)$$

Wir berechnen die Elemente

$$M_{ik}(s, s_d)$$

des Matrizanten $M(s,s_d)$, indem wir die Reihenentwicklung (3.59) nach dem zweiten Glied abbrechen. Wir betrachten

$$M_{ik}(s,s_d) = \delta_{ik} + \int_{s_d}^{s} W_{ik}(r) \exp\left\{i\int^{r}\left(z_k(u)-z_i(u)\right)du\right\}dr. \qquad (3.90)$$

δ_{ik} ist das Kronecker Symbol.

Aus dem Matrizanten $M(s,s_d)$ folgt der Matrizant $G(s,s_d)$ nach der Transformationsformel (3.68)

$$G(s,s_d) = A(s)\ M(s,s_d)\ A^{-1}(s_d) \ . \qquad (3.91)$$

Mit (3.87) erhalten wir für die Elemente des Matrizanten den Ausdruck

$$G_{ik}(s_c,s_d) = \exp\left\{i\int_{s_o}^{s_c} z_i(r)\,dr\right\} \exp\left\{-i\int_{s_o}^{s_d} z_k(r)dr\right\} M(s_c,s_d). \qquad (3.92)$$

Mit (3.90) ergibt sich

$$G_{ik}(s_c,s_d) = \exp\left\{i\int_{s_o}^{s_c} z_i(r)dr\right\}\exp\left\{-i\int_{s_o}^{s_d} z_k(r)dr\right\}\cdot$$

$$\left[\delta_{ik} + \int_{s_d}^{s_c} W_{ik}(v)\exp\left\{i\int_{s_o}^{v}\left(z_k(r)-z_i(r)\right)dr\right\}dv\right]. \qquad (3.93)$$

Aus diesem Matrizanten ergibt sich die Streumatrix nach der Formel (3.83). Die Streumatrix enthält die für

uns interessanten Werte der Reflexions- und Durchlaßkoeffizienten.

Bei der Reflexionsphotometrie interessieren uns speziell die Reflexionskoeffizienten. Um eine für die Praxis brauchbare Formel zu gewinnen, werden wir weitere vereinfachende Näherungen vornehmen.

s_o ist eine Integrationskonstante, die noch beliebig wählbar ist. Außerdem ist der Nullpunkt der s-Skala frei wählbar. Wir können daher

$$s_o = 0 \tag{3.94}$$

und

$$s_d = 0 \tag{3.95}$$

setzen.

Nehmen wir an, unsere Objekte seien so dick, daß das Licht nur reflektiert wird und das Objekt von keinem Licht durchdrungen wird. In diesem Sinne ersetzen wir s_c durch das Zeichen ∞.

Wir nehmen an, daß die Kopplungsgrößen

$$B = W_{ik}(s) \tag{3.96}$$

der verschiedenen Wellenarten und die Werte z_i in dem gesamten Objekt konstant sind. Das heißt, die Lichtabsorption und das Lichtstreuungsvermögen sind gleichartig in der ganzen Probe. Wir verzichten außerdem auf die Unterscheidung der Polarisationsrichtungen. Aus (3.83) und (3.93) folgt

$$Q = \left| B \int_o^\infty \exp i\{(z_1 - z_2)\, r\}\, dr \right| . \tag{3.97}$$

Q ist der Betrag des Quotienten aus der Amplitude der reflektierten Wellen und der Amplitude der eingestrahlten Wellen. z_1 und z_2 sind die Eigenwerte der Matrix T (vergleiche (3.40)). Es sind konjugiert komplexe Lösungen

$$z_1 = n + i u, \tag{3.98}$$

$$z_2 = n - i u \tag{3.99}$$

des dazugehörigen charakteristischen Polynoms. $\pm i u$ beschreibt die Lichtschwächung durch Absorption und Streuung, während n den oszillierenden Anteil der Wellen wiedergibt. n entspricht dem üblichen Realteil des Brechungsindexes in der Optik. Es folgt mit den Beziehungen (3.98) und (3.99) der Ausdruck

$$Q = \left| \frac{B}{2u} \right| . \tag{3.100}$$

Uns interessiert die Intensität des reflektierten Lichtes. Als Reflexionsvermögen $r(\lambda)$ bezeichnen wir den Quotienten aus der Intensität der reflektierten Strahlung und der Intensität des eingestrahlten Lichtes.[45,82] Aus (3.100) erhalten wir damit

$$r(\lambda) = Q^2 \tag{3.101}$$

oder

$$r(\lambda) = \frac{B^2}{4\, u^2(\lambda)} . \tag{3.102}$$

Die Lichtschwächung, die durch die Größe $u^2(\lambda)$ beschrieben wird, setzt sich aus Verlusten durch Streuung a_o und der Extinktion je Wegeinheit $k(\lambda)$, die durch Ab-

sorption erfolgt, zusammen

$$u^2(\lambda) = k(\lambda)\frac{1}{2}\ln 10 + a_o . \qquad (3.103)$$

Um den Zusammenhang zum Lambert-Beerschen Gesetz zu wahren, wird der Faktor $\frac{1}{2}\ln 10$ hinzugefügt. Die Extinktion je Wegeinheit $k(\lambda)$ rührt von Stoffen her, deren Konzentrationen x_i wir erfassen möchten. Wie wir aus dem Lambert-Beerschen Gesetz wissen, ist

$$k(\lambda) = \sum_{i=1}^{N} x_i \hat{\varphi}_i(\lambda) \qquad (3.104)$$

eine Linearkombination aus den Extinktionen je Wegeinheit $\hat{\varphi}_i(\lambda)$ der Grundkomponenten. Ob und in welcher Art der Streukoeffizient a_o von der Wellenlänge abhängt, ist ohne Experimente nicht zu entscheiden. Wir erhalten für das Reflexionsvermögen

$$r(\lambda) = \frac{B^2}{2k(\lambda)\ln 10 + 4a_o} \qquad (3.105)$$

oder

$$r(\lambda) = \frac{\varrho}{k(\lambda) + a} \qquad (3.106)$$

mit

$$\varrho = \frac{B^2}{2\ln 10} \qquad (3.107)$$

und

$$a = \frac{2a_o}{\ln 10} . \qquad (3.108)$$

Wir vergleichen die Intensität des an der Probe reflektierten Lichtes mit dem Reflexionsvermögen an einem Standard.

$$R = \frac{r_{Probe}}{r_{Standard}} \qquad (3.109)$$

sei das bei (unendlich) großer Schichtdicke gemessene relative Reflexionsvermögen. Wir erhalten aus (3.106) mit

$$r_{Standard} = \frac{S}{a} \qquad (3.110)$$

die Beziehung

$$R(\infty) = \frac{a}{k(\lambda) + a} \quad . \qquad (3.111)$$

Die Formel wird dann eine relativ gute Näherung sein, wenn die Wahrscheinlichkeit, daß das Licht in einem gewissen Bereich absorbiert wird, größer ist,als daß es gestreut wird. Die Approximation (3.90) des Matrizanten $M(s_c,s_d)$ hat die physikalische Bedeutung, daß man annimmt, daß nur einfach gestreutes Licht in den Empfänger gelangt. Wenn wir für die Berechnung des Matrizanten (3.90) weitere Glieder berücksichtigen, sind wir mit diesem Formalismus in der Lage, auch die Mehrfachstreuung zu erfassen. Erst dann wird sich der hier dargestellte Formalismus als besonders übersichtlich und zweckmäßig erweisen.

Verwendet man bei der Formel (3.59) zur Berechnung des Matrizanten $M(s_c,s_d)$ höhere Näherungen, dann kommt man bei gewissen anderen starken Vereinfachungen auf die Formel von Kubelka und Munk[54]

$$\frac{(1-R(\lambda))^2}{R(\lambda)} = \frac{k(\lambda)}{s} \quad . \qquad (3.112)$$

Der Streukoeffizient s ist bei Teilchen, deren Durchmesser größer als die Wellenlänge ist, weitgehend von der Wellenlänge unabhängig. Wie aus den Arbeiten von Kortum[45,46], Vogel[47,48] und Schreyer[38] hervorgeht, zeigt es sich, daß die Formel von Kubelka und Munk (3.112) besonders gut bei pulverförmigen Stoffen, die mit einem großen Überschuß ($1:10^3$) eines nicht absorbierenden aber stark streuenden Standards versehen sind, anwendbar ist.

Es ist ohne Experimente schwer zu entscheiden, wie weit die bei der Herleitung einer derartigen Formel (3.111) oder (3.112) zur Vereinfachung gemachten Annahmen bei unseren biologischen Objekten möglich sind. Darum haben wir Experimente zur Ermittlung des Zusammenhanges zwischen $R(\lambda)$ und $k(\lambda)$ durchgeführt. Im folgenden Abschnitt werden diese Experimente beschrieben und die Resultate mit den theoretisch errechneten Beziehungen verglichen.

3.2. Experimentelle Untersuchungen zur Reflexionsphotometrie

In diesem Abschnitt betrachten wir die Entstehung der Spektren im reflektierten Licht noch einmal von einer anderen Seite. Wir versuchen mit Hilfe von Experimenten an Homogenaten die optischen Eigenschaften der Objekte zu ermitteln.

Das Licht, welches auf das Objekt fällt, wird zum Teil an der Oberfläche reflektiert. Der Rest des Lichtes dringt in die Probe ein, um nach ein- oder mehrfacher Streuung entweder absorbiert zu werden oder wieder aus der Probe auszutreten. Je länger der Weg des Lichtes in dem Objekt ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß das Licht absorbiert wird. Hat das Licht einen Weg der Länge x zurückgelegt, so wird der Anteil

$$\left(1 - e^{-\hat{k}(\lambda)\, x} \right) \tag{3.113}$$

absorbiert worden sein. $\hat{k}(\lambda)$ ist die Absorptionskonstante, sie beschreibt die Abnahme der Lichtintensität $\frac{dL}{dx}$ je Wegeinheit und je Einheit der Lichtintensität L, die ausschließlich durch Absorption erfolgt. $\hat{k}(\lambda)$ ist also wie folgt definiert

$$\hat{k}(\lambda) = \frac{1}{L(x,\lambda)} \cdot \frac{dL(x,\lambda)}{dx} \,. \tag{3.114}$$

Zum Vergleich sei der entsprechende Ausdruck

$$k(\lambda) = \frac{1}{L(x,\lambda)} \cdot \frac{dL(x,\lambda)}{dx} \cdot \lg e \tag{3.115}$$

des im letzten Abschnitt benutzten $k(\lambda)$ (siehe (3.107)) wiedergegeben. Dieses $k(\lambda)$ unterscheidet sich von dem

$\hat{k}(\lambda)$ durch den Faktor lg e. Dieser Faktor lg e wurde dazugesetzt, um den Zusammenhang mit dem Lambert-Beerschen Gesetz[45] zu wahren. Entsprechend führen wir die Größen $\hat{a}$ und $\hat{\varsigma}$ ein. Wir erhalten

$$a = \hat{a} \lg e , \tag{3.116}$$

$$\varsigma = \hat{\varsigma} \lg e . \tag{3.117}$$

Damit ergibt sich aus (3.107) die Beziehung

$$r(\lambda) = \frac{\hat{\varsigma}}{\hat{a} + \hat{k}(\lambda)} . \tag{3.118}$$

Für die Intensität $r(\hat{k}, \lambda)$ des reflektierten Lichtes machen wir den Ansatz

$$r(\hat{k}, \lambda) = r_o(\lambda) \int_0^\infty e^{-\hat{k}x} \, dW(x, \lambda) . \tag{3.119}$$

$r_o(\lambda)$ ist die Intensität des Lichtes, welches bei einem entsprechenden absorptionsfreien Medium wieder in den Empfänger gelangen würde. $W(x,\lambda)$ ist eine Verteilungsfunktion nach Kolmogoroff.[116] Dieses $W(x, \lambda)$ ist eine nicht abnehmende linksseitig stetige Funktion der Variablen x, ihr Wert ist die Wahrscheinlichkeit, daß das Licht bei fehlender Absorption einen Weg $< x$ in der Probe zurückgelegt hat. Die Funktion $W(x, \lambda)$ ist so normiert, daß

$$\lim_{x \to \infty} W(x, \lambda) = 1 \tag{3.120}$$

gilt. Das Integral (3.119) ist im Sinne eines Stiltjesschen Integrals aufzufassen. Ist $W(x, \lambda)$ nach x stetig differenzierbar, so können wir die Wahrscheinlichkeitsdichte

$$\psi(x, \lambda) = \frac{dW(x, \lambda)}{dx} \tag{3.121}$$

einführen. Aus der Normierung (3.120) für $W(x, \lambda)$ folgt für die Normierung von $\Psi(x, \lambda)$ der Ausdruck

$$\int_0^\infty \Psi(x, \lambda)\, dx = 1. \qquad (3.122)$$

Mit (3.121) erhalten wir für die Intensität des reflektierten Lichtes aus (3.119) die Beziehung

$$r(\hat{k}, \lambda) = r_o(\lambda) \int_0^\infty \Psi(x, \lambda)\, e^{-\hat{k} x}\, dx . \qquad (3.123)$$

$r(\hat{k}, \lambda)$ ist eine Funktion der Konzentrationen der absorbierenden Stoffe in der Probe.

Die Absorptionskonstante $\hat{k}(\lambda)$ ist eine Funktion der Wellenlänge λ. Außerdem hängt der in der Probe zurückgelegte Weg möglicherweise von der Wellenlänge ab. Desgleichen kann die Intensität $r_o(\lambda)$ des Lichtes, welches bei absorptionsfreien Medien wieder in den Empfänger gelangt, von der Wellenlänge abhängen. Diese letztgenannte Wellenlängenabhängigkeit läßt sich dadurch eliminieren, daß man die Signalwerte durch entsprechende Standardsignalwerte dividiert. Wir müssen hier somit eine dreifache Abhängigkeit von der Wellenlänge berücksichtigen.

Ein Ziel der Untersuchungen ist es, das Aussehen der Funktion $\Psi(x, \lambda)$ zu ermitteln. Denn diese Funktion gibt Auskunft, aus welchen Schichten des Untersuchungsmaterials die gemessenen Spektren resultieren und welcher Weg in der Probe zurückgelegt wurde.

Wie man aus der Gestalt des Ausdruckes (3.123) ersieht, ist $r(\hat{k}, \lambda)$ die Laplacetransformierte der Funktion $\Psi(x, \lambda)$. Es handelt sich dabei um eine einseitige

Laplacetransformation. Zum Oberbereich gehört die Variable $\hat{k}$ und zum Unterbereich die Variable x. [16,17]

Unter gewissen einschränkenden Voraussetzungen [16,103] für die Funktion $\Psi(x, \lambda)$ gilt die Umkehrformel

$$\Psi(x, \lambda) = \frac{1}{2\pi i \tau_0} \int_{\sigma - i\infty}^{\sigma + i\infty} r(\hat{k}, \lambda)\, e^{\hat{k}x}\, dx \,. \quad (3.125)$$

Das Integral ist über eine beliebige Gerade zu erstrecken, die zur imaginären Achse parallel verläuft und im Inneren des Streifens

$$\alpha < \sigma < \beta$$

liegt. α und β sind feste reelle Zahlen, die auch $-\infty$ und $+\infty$ sein können. Die Zahlen α und β hängen von dem Verhalten der Funktion $r(k, \lambda)$ ab.

Mit dem Integral (3.125) hat man jedenfalls theoretisch die Möglichkeit, sofern man $r(\hat{k}, \lambda)$ kennt, die Funktion $\Psi(x, \lambda)$ auszurechnen. Eine Schwierigkeit besteht darin, daß man von $r(\hat{k}, \lambda)$ die Werte längs einer zur imaginären Achse parallelen Geraden braucht, um das obige Integral (3.125) bilden zu können. Aus Messungen an Homogenaten, denen wir den speziellen Farbstoff Hämoglobin zugesetzt haben, kennen wir die Funktion $r(\hat{k}, \lambda)$ für reelle $\hat{k}$-Werte. Aus diesen Werten könnte man durch analytische Fortsetzung die Werte längs der zur imaginären Achse parallelen Geraden berechnen, wobei man unter Umständen mit einer ungünstigen Fehlerfortpflanzung zu rechnen hat.

Wir haben einen etwas anderen Weg beschritten. Wir setzen die Funktion $\Psi(x, \lambda)$ als eine Summe von δ-Funktionen

an

$$\Psi(x,\lambda) = \sum_{i=1}^{M} \Psi_i(\lambda)\,\delta(x-x_i)\ . \qquad (3.126)$$

Dieser Ausdruck wird in die Gleichung (3.123) eingesetzt. Wir erhalten

$$r(\hat{k},\lambda) = r_o(\lambda) \int_o^{\infty} \sum_{i=1}^{M} \Psi_i(\lambda)\,\delta(x-x_i)\ e^{-\hat{k}x}dx\ , \qquad (3.127)$$

$$\frac{r(\hat{k},\lambda)}{r_o(\lambda)} = \sum_{i=1}^{M} \Psi_i(\lambda)\ e^{-\hat{k}x_i}\ . \qquad (3.128)$$

Wir[1] haben nun folgende Versuche an Homogenaten des Meerschweinchengehirns vorgenommen. Es wurden einmal die Reflexionsspektren an lebenden blutfrei perfundierten Meerschweinchengehirnen gemessen. Diese Meerschweinchengehirne wurden unter Zusatz von ein wenig Ringerlösung homogenisiert. An diesem homogenisierten Material wurden abermals die Spektren im reflektierten Licht gemessen. Den homogenisierten und möglichst gut oxygierten Meerschweingehirnen wurden nacheinander verschiedene Mengen oxygeniertes Hämoglobin zugemischt, um dann wieder die Spektren zu messen. Die gleichen Mengen Hämoglobin wurden entsprechenden Mengen von Ringerlösung zugesetzt, um dann Spektren im durchfallenden Licht zu messen. Aus diesen zuletzt genannten Versuchen können wir den Wert von $\hat{k}$ entnehmen. Mischen wir dem Homogenat Hämoglobin bei, so wird die Absorption einmal durch Hämoglobin erfolgen, dessen Konzentrationen wir kennen, und zum anderen

1) Die Operationen der Tiere und Praeparation der Gewebe wurden von Schwkardi und Knaust durchgeführt.

durch die Atmungsfermente, die im Homogenat enthalten sind. Wir erhalten

$$\hat{k} = k_o + \tilde{k} \quad . \tag{3.129}$$

k_o beschreibe die zuerst noch unbekannte Absorption durch die Atmungsfermente. In diesem k_o können auch Lichtverluste durch Streuung enthalten sein. Wichtig ist nur, daß die Lichtverluste proportional der gerade vorhandenen Lichtintensität sind. $\tilde{k}$ beschreibt die bekannte Absorption durch das Hämoglobin.

Aus (3.128) folgt

$$\frac{r(\hat{k}, \lambda)}{r_o(\lambda)} = \sum_{i=1}^{M} \psi_i(\lambda)\, e^{-k_o x_i}\, e^{-\tilde{k} x_i}. \tag{3.130}$$

Wir betrachten diese Gleichungen für M verschiedene Werte von $\tilde{k}$. Damit erhalten wir ein Gleichungssystem für die M unbekannten Größen

$$z_i = \psi_i(\lambda)\, e^{-k_o x_i} \quad . \tag{3.131}$$

Die Abhängigkeit von λ interessiert erst einmal hier nicht, sondern die Überlegungen gelten für festes λ. Diese Untersuchungen werden dann für verschiedene λ wiederholt.

Setzen wir zur Abkürzung

$$A_{ni} = e^{-\tilde{k}_n x_i} \qquad \text{für } n=1 \text{ bis } M, \quad i=1 \text{ bis } M, \tag{3.132}$$

und

$$B_n = \frac{r(k_n, \lambda)}{r_o(\lambda)} \qquad \text{für } n=1 \text{ bis } M, \tag{3.133}$$

so lautet das Gleichungssystem (3.130)

$$\sum_{i=1}^{M} A_{ni} z_i = B_n \quad \text{für } n = 1 \text{ bis } M. \tag{3.134}$$

Dieses Gleichungssystem lösen wir nach den Größen z_i auf. Kennen wir die Größen z_i, so kennen wir noch nicht unmittelbar die gesuchten Größen $\Psi_i(\lambda)$. Aus der Normierungsbeziehung (3.122) folgt

$$\sum_{i=1}^{M} \Psi_i(\lambda) = 1 . \tag{3.135}$$

Diese Bedingung benutzen wir, um die Größe k_o zu errechnen. Aus (3.131) und (3.135) folgt eine Beziehung für k_o, in der die anderen Größen als bekannt angesehen werden können. Wir erhalten

$$\sum_{i=1}^{M} z_i \, e^{k_o x_i} = 1 \tag{3.136}$$

oder

$$f(k_o) = 1 \tag{3.137}$$

mit

$$f(k_o) = \sum_{i=1}^{M} z_i \, e^{k_o x_i} . \tag{3.138}$$

Wegen ihrer physikalischen Bedeutung sind die Größen $\Psi_i(\lambda) \geq 0$. Aus (3.130) folgt dann, daß auch $z_i \geq 0$ gilt. Daraus läßt sich folgern, daß f(u) eine mit u monoton wachsende Funktion ist. Zur Berechnung von k_o nehmen wir einen Wert u_1, für den

$$f(u_1) < 1 , \tag{3.139}$$

und einen Wert u_2, für den

$$f(u_2) > 1 . \tag{3.140}$$

Dann halbieren wir das Intervall $u_2 - u_1$. Wir erhalten

$$u_m = \frac{u_1 - u_2}{2} . \tag{3.141}$$

Nun bilden wir $f(u_m)$. Ist $f(u_m) < 1$, so nehmen wir u_m als neuen Wert für u_1. Ist andererseits $f(u_m) > 1$, so nehmen wir u_m als neuen Wert für u_2. Danach halbieren wir wieder das Intervall und stellen entsprechende Überlegungen an. Nach dem ν-ten derartigen Schritt kennt man den gesuchten Wert von k_o bis auf einen Fehler, der nicht größer als $(u_1-u_2)/2^\nu$ ist. u_1 und u_2 sind in dieser Abschätzung die primär gewählten Werte von u_1 und u_2. Dieses Verfahren eignet sich besonders gut für digitale Rechenmaschinen. Es hat den Vorteil, daß eine exakte Fehlerabschätzung möglich ist, von der man andererseits sofort auf die nötige Zahl der erforderlichen Schritte schließen kann.[1)]

Die Lösung des Gleichungssytems (3.134) erfolgte auf der TR4 des Marburger Rechenzentrums mit dem Programm 67-11-D21 (siehe Anhang). Wir haben M = 11 gesetzt, so daß wir elf Werte Ψ_i errechnen können. In dem Programm erfolgt die Lösung des linearen Gleichungssystems mit Hilfe des Gaußschen Algorithmus. Anschließend wird in dem Programm 67-11-D21 mit der oben beschriebenen Methode die Größe k_o berechnet. Auf den folgenden Bildern sind

[1)] Das Verfahren entspricht dem Verfahren am Schluß des siebenten Kapitels zur Berechnung inhomogener Hämoglobinverteilungen.

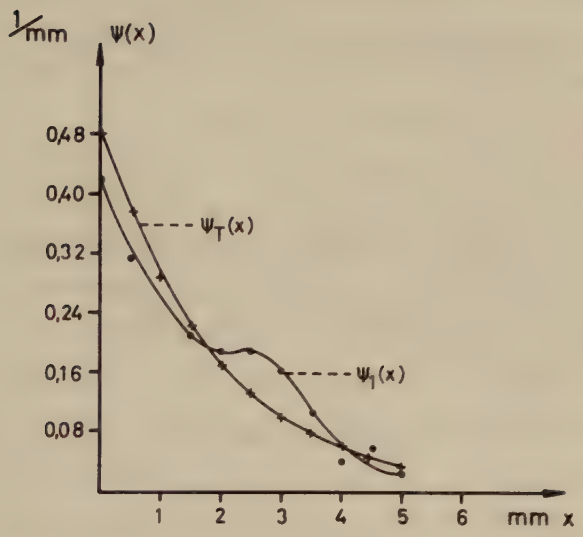


Abb.3.1.

Wahrscheinlichkeitsdichte $\Psi_1(x)$ für den im Meerschweinchengehirn zurückgelegten Weg des Lichtes x bei einer Wellenlänge von 585 nm. Zum Vergleich dazu eine nach der Theorie des ersten Teiles dieses Kapitels errechnete Kurve $\Psi_T(x)$.

die Ergebnisse dieser Experimente und Rechnungen dargestellt.

Auf dem Bild 3.1 ist die Funktion $\Psi(x,\lambda)$ für eine Wellenlänge von λ = 585nm wiedergegeben. Aus dieser Wahrscheinlichkeitsdichte $\Psi(x,\lambda)$ läßt sich durch den folgenden Ausdruck

$$\overline{x}(\lambda) = \int_0^\infty x\,\Psi(x,\lambda)\,dx \qquad (3.142)$$

der Mittelwert oder Erwartungswert für den in der Probe zurückgelegten Weg x berechnen. Als Ergebnis erhalten wir bei der Wellenlänge λ= 585nm den Wert

$$\overline{x} = 1{,}50\text{mm}\,. \qquad (3.143)$$

Als zweite Kurve $\Psi_T(x)$ wurde auf dem Bild (3.1) eine Kurve eingezeichnet, wie sie der Theorie des ersten Teiles dieses Kapitels entspricht. Bei der Laplaceschen Rücktransformation (3.125) entspricht

$$r(\hat{k}(\lambda)) = \frac{\hat{s}}{\hat{k}(\lambda) + \hat{a}} \qquad [3.118]$$

der Funktion

$$\Psi_T(x) = \hat{a}\, e^{-\hat{a}x}\,. \qquad (3.144)$$

Diese Funktion $\Psi_T(x)$ genügt außerdem der Normierungsbedingung

$$\int_0^\infty \Psi_T(x)\,dx = 1\,. \qquad [3.122]$$

Der freie Parameter $\hat{a}$ wurde so gewählt, daß wir mit den gemessenen Verteilungskurven möglichst gute Übereinstimmung erhalten. Es ergibt sich ein Wert von

$$\hat{a} = 0{,}48/\text{mm} \; . \qquad (3.145)$$

Bedenkt man die physikalisch sehr unübersichtlichen Verhältnisse in den biologischen Objekten, so dürfte hiermit gezeigt sein, daß wir mit der hergeleiteten Formel (3.118) eine sehr brauchbare Arbeitsformel gewonnen haben. Diese Formel können wir allerdings nur benutzen, wenn wir, wie hier durch Experimente, die fehlenden Parameter ermittelt haben. Diese Parameter werden sich bei den verschiedenen Geweben stark unterscheiden.

Auf der Abbildung 3.2 haben wir einen anderen Wellenlängenbereich gewählt, und zwar liegen diesen Ergebnissen Messungen mit der Wellenlänge 485 nm zugrunde. Der Erwartungswert für den in der Probe zurückgelegten Weg steigt hier auf

$$\overline{x} = 1{,}77 \text{ mm} \qquad (3.146)$$

an. Die Kurve ist zwischen 1 und 3mm etwas flacher als die entsprechende Kurve auf der Abbildung 3.1. Der Wiederanstieg der Kurve zwischen 2,5 und 3,0mm ist eindeutig stärker ausgeprägt als beim langwelligeren Licht. Wir vermuten, daß dieser Wiederanstieg der Wahrscheinlichkeitsdichte ein Effekt der Mehrfachstreuung des Lichtes ist. Die theoretische Deutung des Wiederanstieges der Wahrscheinlichkeitsdichten erfolgt später.

Die Experimente bei Wellenlängen von 450-600nm ergaben das sehr wichtige Resultat. Wir können die Wahrscheinlichkeitsdichte $\Psi(x, \lambda)$ in diesem Wellenlängenbereich für alle Wellenlängen durch die gleiche theoretische Funktion relativ gut annähern. Das ist insofern bemer-

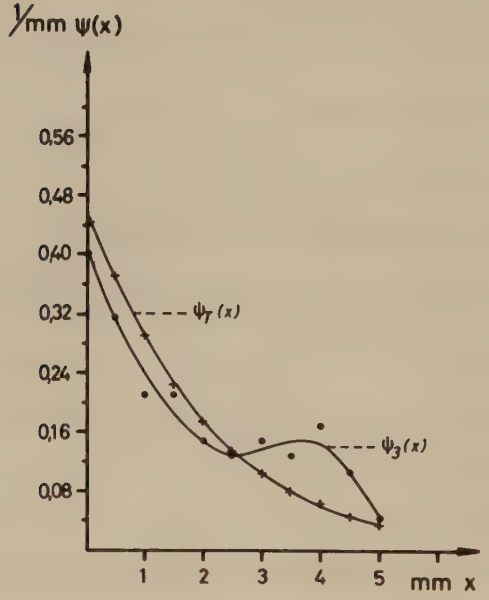


Abb.3.2.

Wahrscheinlichkeitsdichte $\Psi_3(x)$ für den im Meerschweinchengehirn zurückgelegten Weg des Lichtes x bei einer Wellenlänge von 485 nm. Zum Vergleich dazu eine nach der Theorie des ersten Teiles dieses Kapitels errechnete Kurve $\Psi_T(x)$.

kenswert, da bei Reflexionsspektren bei kurzwelligerem Licht auffallend weniger Lichtintensität wieder in den Empfänger gelangt. Dieser Effekt wird zum größten Teil durch die oben beschriebene Bestimmung des Wertes $k_o(\lambda)$ eliminiert. In $k_o(\lambda)$ ist nicht nur die Absorption durch die Atmungsfermente enthalten, sondern auch Lichtverluste durch Streuung.

Auf der Abbildung 3.3 ist die Wahrscheinlichkeit $W(x,\lambda)$, daß das Licht einen Weg kleiner als x zurückgelegt hat, für einen Wellenlängenbereich von 570-600 nm wiedergegeben. Aus diesem Bild ersieht man die diesen Ausführungen zugrundeliegenden Annäherungen. Die in der Natur sicher stetige Funktion $W(x, \lambda)$ der Variablen x wird durch eine Treppenfunktion angenähert. Auf dem Bild ist ferner die entsprechende theoretische Funktion $W_T(x)$ wiedergegeben. Die Funktion $W_o(x)$ würde dem Fall entsprechen, daß man für die Reflexionsspektren das Lambert-Beersche Gesetz benutzen würde und eine Schichtdicke annimmt, die gleich dem Erwartungswert für den in der Probe zurückgelegten Weg ist.

Die Erklärung der relativen Maxima der Funktionen $\Psi(x, \lambda)$ bei $x \neq 0$

In diesem Teilabschnitt soll erläutert werden, daß die bei den Funktionen $\Psi(x, \lambda)$ gefundenen relativen Maxima bei $x \neq 0$ durchaus physikalischen Gegebenheiten entsprechen und daß man nicht annehmen braucht, daß diese relativen Maxima durch Meß- oder Rechenfehler bedingt sind.

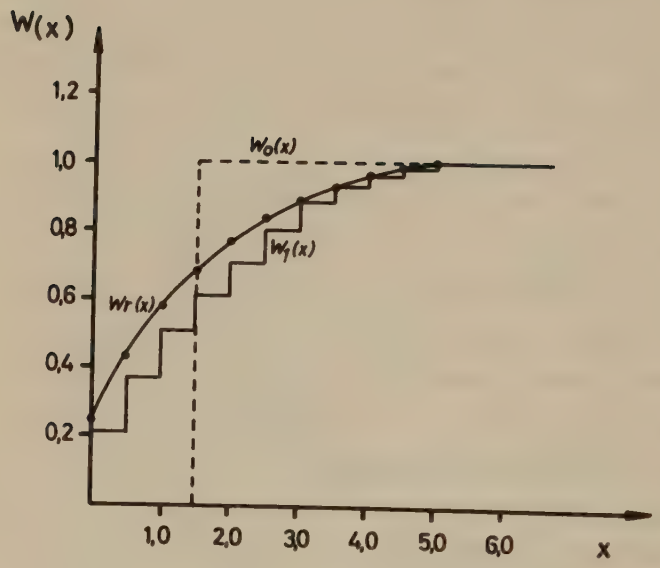


Abb.3.3.

Wahrscheinlichkeit $W(x, \lambda)$ für einen im Meerschweinchengehirn zurückgelegten Weg $< x$ für Licht von $\lambda = 585$ nm. Zum Vergleich dazu eine nach der Theorie des ersten Teiles dieses Kapitels errechnete Kurve $W_r(x)$. $W_o(x)$ entspricht dem Fall, daß man in der Reflexionsphotometrie näherungsweise das Lambert-Beersche Gesetz benutzt mit einer Schichtdicke, die dem Erwartungswert für den zurückgelegten Weg entspricht.

Das Licht, welches in die Probe eintritt, wird entweder absorbiert, oder es gelangt nach ein- oder mehrfacher Streuung wieder aus der Probe heraus. Die Absorption berücksichtigen wir dadurch, daß wir annehmen, daß der Anteil

$$(1 - e^{-\hat{k}(\lambda)\,x})\, I(x) \qquad (3.147)$$

des Lichtes $I(x)$, welches einen Weg x in der Probe zurückgelegt hat, absorbiert worden ist.

Um einen Überblick zu bekommen, sehen wir erst einmal von der Möglichkeit ab, daß das Licht wieder aus der Probe austritt. Wir errechnen uns unter dieser Bedingung die Lichtintensität je Wegeinheit in Abhängigkeit von dem in der Probe zurückgelegten Weg x und in Abhängigkeit von der Häufigkeit des Streuvorganges. Es sei $I_n(x)$ die Intensität des Lichtes je Wegeinheit, welches N mal gestreut worden ist. Wir können annehmen, daß es sich bei der Lichtstreuung um einen statistischen Vorgang handelt, der bei gegebenem Objekt nur von der Intensität des vorhandenen Lichtes abhängt. Das bedeutet, daß die streuenden Partikel homogen über das Objekt verteilt sind. Nach diesen Vorstellungen ergibt sich für das noch nicht gestreute Licht $I_o(x)$ die Differentialgleichung

$$\frac{dI_o(x)}{dx} + s\, I_o(x) = 0 \,. \qquad (3.148)$$

s ist eine Materialkonstante, die die Streuwahrscheinlichkeit charakterisiert. Entsprechendes gilt für N-fach gestreutes Licht ($N \geq 1$), nur daß dort der Zuwachs von dem (N-1) mal gestreuten Licht mit berücksichtigt werden

muß. Wir erhalten

$$\frac{dI_N(x)}{dx} + s\, I_N(x) = s\, I_{N-1}(x) \,. \qquad (3.149)$$

Die Lösung der homogenen linearen Differentialgleichung 1.Ordnung (3.148) mit der Anfangsbedingung

$$I_o(x) = I_o(0) \quad \text{für } x = 0 \qquad (3.150)$$

lautet [103]

$$I_o(x) = I_o(0)\, e^{-s\,x} \,. \qquad (3.151)$$

Die Lösung der inhomogenen linearen Differentialgleichung 1.Ordnung (3.149) lautet [103]

$$I_N(x) = s\, e^{-s\,x} \int_o^x I_{N-1}(u)\, e^{s\,u}\, du. \qquad (3.152)$$

Dabei ist die Anfangsbedingung $I_N(0) = 0$ berücksichtigt. Diese Anfangsbedingung hat die physikalische Bedeutung, daß das in die Probe eintretende Licht noch nicht gestreut worden ist.

Setzen wir (3.151) in (3.152) ein, so erhalten wir einen Ausdruck für $I_1(x)$. Diesen Ausdruck können wir wieder in (3.152) einsetzen. In dieser Weise fortfahrend erhalten wir

$$I_N(x) = I_o(0)\, \frac{(s\,x)^N}{N!}\, e^{-s\,x} \,. \qquad (3.153)$$

Diese Formel beschreibt die Lichtintensität je Wegeinheit für N-fach gestreutes Licht in Abhängigkeit von der Länge des zurückgelegten Weges x. Dabei ist stets vorausgesetzt, daß kein Licht absorbiert wird oder aus der Pro-

be austritt.

Diese Formel gilt für $N \geq 1$, sie gilt, wie man aus (3.151) ersieht, auch für $N = 0$.

Auf der Abbildung 3.4 sind die Funktionen $I_0(x)$, $I_1(x)$ und $I_2(x)$ wiedergegeben. Mit wachsendem N verschiebt sich das Maximum immer mehr nach rechts, und die Kurven werden immer flacher. Die Zahl N ist gleichzeitig die Ordnung der Nullstelle der Funktion $I_N(x)$ bei $x = 0$.

Will man die Absorption mit berücksichtigen, so hat man in (3.153) nur den Faktor $e^{-\hat{k}(\lambda)x}$ zu ergänzen. Die Absorption interessiert in diesem Zusammenhang nicht, da wir Aussagen über die Wahrscheinlichkeitsdichte $\Psi(x,\lambda)$ für den in der Probe zurückgelegten Weg machen möchten. Die Funktion $\Psi(x, \lambda)$ ist für den absorptionsfreien Fall definiert. Die Absorption wird erst bei der Berechnung der Intensität des reflektierten Lichtes $r(\hat{k}, \lambda)$ nach der Formel

$$r(\hat{k}, \lambda) = r_o(\lambda) \int_0^\infty \Psi(x,\lambda)\ e^{-\hat{k}x}\, dx \qquad [3.123]$$

berücksichtigt.

Die Ausdrücke (3.153) enthalten als wesentliche hypothetische Annahme nur, daß das Licht nicht wieder aus der Probe austritt.

Jetzt sind wir in der Lage, die gefundenen Verläufe von der Wahrscheinlichkeitsdichte $\Psi(x, \lambda)$ zu erklären. Wenn nur Licht, welches mehrfach gestreut wurde, wieder als "reflektiertes" Licht aus der Probe austritt, so würde $\Psi(x, \lambda)$ einen Verlauf zeigen, der den Funktionen

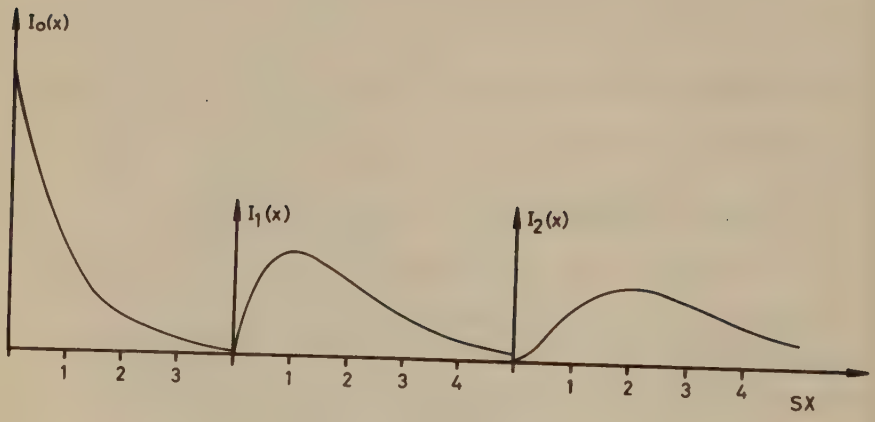


Abb.3.4.

Die Lichtintensität je Wegeinheit für kein- ($I_0(x)$), ein-($I_1(x)$) und zweimal ($I_2(x)$) gestreutes Licht in Abhängigkeit vom zurückgelegten Weg x. s ist ein Parameter, der die Streuwahrscheinlichkeit beschreibt.

$I_N(x)$ für $N > 0$ entspricht. $\Psi(x,\lambda)$ wäre eine bei $x = 0$ von Null ansteigende Funktion, die nach Erreichen eines Maximums wieder abfällt. Offenbar ist bei den gefundenen Funktionen $\Psi(x,\lambda)$ eine derartige Funktion überlagert. Der eben beschriebene Fall würde zum Beispiel eintreten, wenn das Licht im wesentlichen stets vorwärts gestreut wird. Von der Art, Form und Verteilung der streuenden Partikel in den Objekten wird es abhängen, welche der errechneten Funktionen $I_N(x)$ wesentlich $\Psi(x,\lambda)$ bestimmen. Auch die Richtung des eingestrahlten und die Richtung des erfaßten reflektierten Lichtes werden möglicherweise Einfluß auf die Zusammensetzung von $\Psi(x,\lambda)$ aus verschieden häufig gestreutem Licht haben.

Nach der Differentialgleichung (3.148) entspricht dem Verlauf von $I_0(x)$ auch die Entstehungsrate von $I_1(x)$. Entsprechend beschreibt die Funktion $I_N(x)$ die Wahrscheinlichkeitsdichte für die N+1.Streuung des Lichtes. Nur wenn nach dem ersten Streuvorgang die Hauptmenge des Lichtes wieder aus der Probe austritt, wird man einen streng monotonen Verlauf der Funktion $\Psi(x,\lambda)$ erwarten können ohne relatives Maximum bei einem Werte $x \neq 0$.

Das stärkere Hervortreten des relativen Maximums bei kürzeren Wellenlängen läßt sich damit erklären, daß für kürzere Wellenlängen das Licht stärker gestreut wird und daher der Anteil des mehrfach gestreuten Lichtes stärker überwiegt.

Zusammenfassend sei noch einmal die im ersten Teil dieses Kapitels theoretisch hergeleitete Formel

$$r(\lambda) = \frac{\hat{\varsigma}}{\hat{a} + \hat{k}(\lambda)} \qquad [3.118]$$

für die Intensität des reflektierten Lichtes $r(\lambda)$ hervorgehoben. Versucht man, die gemessenen Wahrscheinlichkeitsdichten möglichst gut mit der Wahrscheinlichkeitsdichte, die aus der eben zitierten Formel folgt, in Übereinstimmung zu bringen, so erhalten wir einen Wert $\hat{a} = 0{,}48/\text{mm}$ für das Meerschweinchengehirn. Die Größe $\hat{\varsigma}$ richtet sich nach den Objekten im Vergleichskanal des Rapidspektrophotometers. Diese Formel (3.118) zeichnet sich durch ihre Einfachheit aus bei noch einigermaßen guter Übereinstimmung mit den gemessenen Werten. Mit der hier beschriebenen Theorie ist man in der Lage, auch Beziehungen herzuleiten, die wesentlich genauer die Feinheiten beschreiben. Dieser Gewinn muß erkauft werden durch aufwendigere Formeln, die dann mehrere Parameter enthalten, welche empirisch bestimmt werden müssen.

Die hier dargestellten Ergebnisse stehen in einer guten Übereinstimmung mit Experimenten, die wir an Gewebsschnitten von Meerschweinchengehirnen durchführten.

Diese Experimente haben wir angestellt, um eine Vorstellung zu haben, bis zu welchen Schichttiefen das Gewebe noch an der Signalbildung beteiligt ist. Die benutzten Schnitte hatten eine Dicke von 1-3mm. Es zeigte sich, daß bei Schnitten, die dicker als 2mm waren, wir keine Signaländerungen bekamen, wenn wir die Schnitte statt auf eine weiße auf eine schwarze Unterlage legten. Daraus haben wir gefolgert, daß das Licht, welches in den

Empfänger gelangt, nichts mit dem Gewebe zu tun gehabt hat, welches tiefer als 2mm liegt. Bei Schnitten von 1mm Dicke bekamen wir deutlich Signalverformungen. Bei den Ergebnissen mit der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion $\Psi(x,\lambda)$ muß man berücksichtigen, daß eventuell ein Zickzackweg zurückgelegt worden ist. Auf jeden Fall muß bedacht werden, daß die Eindringtiefe in die Probe höchstens die Hälfte des zurückgelegten Weges sein kann. Wenn man das bedenkt, so besteht eine gute Übereinstimmung mit den Experimenten an Gewebsschnitten.

Wir haben zusammen mit Schwickardi[99] und Knaust[44] die Reflexionsspektren von Homogenaten des Meerschweinchengehirnes mit den Spektren im durchfallenden Licht verglichen. Die Reflexionsspektren glichen näherungsweise den Spektren im durchfallenden Licht, wenn diese mit einer Schichtdicke von 1,2mm aufgenommen wurden. Diese näherungsweise Übereinstimmung war nur dann zu erzielen, wenn man bei den Reflexionsspektren eine monoton mit der Wellenlänge fallende Kurve als Bezugslinie annahm, die nicht vom Redoxzustande des Homogenates abhing.

Auch dieser Wert von 1,2mm paßt gut zu den hier gefundenen Resultaten.

Zum Abschluß dieses Kapitels sei noch eine Methode erwähnt, die es uns am lebenden Gewebe gestattet, Aussagen über die Eindringtiefe des Lichtes in die Gewebe zu erhalten. Mit Hilfe von speziellen wasserstoffempfindlichen Elektroden ist es Lübbers erstmalig gelungen, in Mikrodimensionen Wasserstoffauswaschkurven zu messen.[1)]

[1)] Lübbers, D.W., H.Kessler, K.Knaust, D.G.Mc Dowall und R.Wodick: Die Verwendung von Wasserstoff und Sauerstoff zur Messung der lokalen Gewebedurchblutung in situ mit der Platinelektrode. Pflügers Arch. 289, 99 (1966).

Aus diesen Auswaschkurven können wir auf die lokale Durchblutung schließen. Mit diesen Durchblutungswerten können wir zusammen mit Blutauswaschkurven das Verhältnis des Gefäßvolumens zum Volumen der gefäßfreien Gebiete ermitteln. Da das Hämoglobin das Licht sehr viel stärker absorbiert als das übrige Gewebe, lassen sich aus den Reflexionsspektren dann Rückschlüsse auf die Eindringtiefe ziehen. Dringt Licht nur wenig in das Gewebe ein, so wird nur ein geringer Teil des Lichtes mit Hämoglobin in Berührung kommen, das heißt, es wird weniger Licht absorbiert werden. (Siehe 7.Kapitel, wo die Theorie der inhomogenen Farbstoffgemische genauer beschrieben wird.)

4.Kapitel

Die Auswertung eines N-Komponentensystems bei rein multiplikativer Farbmischung

Für verdünnte, klare, homogene Lösungen im durchfallenden Licht gilt das auf mehrere Komponenten erweiterte Lambert-Beersche Gesetz [45,82]

$$L(\lambda) = L_0(\lambda)\, 10^{-E(\lambda)}, \tag{4.1}$$

$$E(\lambda) = \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu\, \varepsilon_\nu(\lambda)\, d \quad . \tag{4.2}$$

Die dekadische Extinktion $E(\lambda)$ ist eine Linearkombination der molekularen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_\nu(\lambda)$ mit den Konzentrationen x_ν als Faktoren. $L_0(\lambda)$ ist die Intensität des auf die Probe geschickten Lichtes, während $L(\lambda)$ die Intensität des durchgefallenen Lichtes ist. Die molekularen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_\nu(\lambda)$ fassen wir mit der Schichtdicke d zu den Funktionen

$$\varphi_\nu(\lambda) = \varepsilon_\nu(\lambda)\, d \tag{4.3}$$

zusammen. Damit erhalten wir für die Extinktion $E = y(\lambda)$ den Ausdruck

$$y(\lambda) = \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu\, \varphi_\nu(\lambda) \quad . \tag{4.4}$$

Das Lambert-Beersche Gesetz gilt nur dann, wenn es sich um eine rein multiplikative Farbmischung handelt. Die Intensität des durchfallenden Lichtes

$$L(\lambda) = L_o(\lambda) \prod_{\nu=1}^{N} f_\nu^{x_\nu d}(\lambda) \qquad (4.5)$$

ergibt sich als ein Produkt der einzelnen Farbkomponenten $f_\nu^{x_\nu d}(\lambda)$. Dabei beschreiben wieder die Werte x_ν die Konzentrationen der Farbstoffe in der Probe, d die Dicke der Küvette und $L_o(\lambda)$ die Intensität des einfallenden Lichtes.

Für die Auswertung der mit dem Rapidspektrophotometer gemessenen Extinktionsspektren

$$y(\lambda) = \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) \qquad [4.4]$$

bestehen zwei wesentliche Probleme.

Das erste Problem ist, daß man das Auswertverfahren findet, bei dem der für die Konzentrationen x_ν zu erwartende Fehler ein Minimum annimmt.

Das zweite Problem besteht darin, das gefundene Auswertverfahren praktisch anzuwenden. Es besteht dabei die Forderung, daß die Auswertung möglichst schnell erfolgt. Die Lösung dieses zweiten Problems wird im sechsten Kapitel behandelt.

In diesem Kapitel soll das Problem gelöst werden, alle Information, die in den gemessenen Extinktionskurven $y(\lambda)$ über die Farbstoffkonzentrationen x_ν enthalten ist, zu erfassen.

Ehe wir mit den theoretischen Überlegungen beginnen, sei kurz auf eine der vielen Anwendungsmöglichkeiten hingewiesen. Die im ersten Kapitel beschriebenen Nucleosidgemische stellen ein Anwendungsbeispiel dieser Theorie

dar; denn die Objekte sind klare Flüssigkeiten, die wir in der Küvette photometrieren können. Auf der Abbildung 1.6 sieht man auf dem unteren Teil die vier in Frage kommenden Grundkomponenten $\varphi_\nu(\lambda)$: Adenosin, Guanosin, Cytosin und Uridin. Auf der oberen Hälfte der Abbildung sehen wir ein Summenspektrum aus den vier Komponenten. Aus derartigen Summenspektren $y(\lambda)$ sollen die Anteile der einzelnen Komponenten möglichst genau errechnet werden.

Um aus der gemessenen Extinktionskurve

$$y(\lambda) = \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) \qquad [4.4]$$

die Konzentrationen x_ν zu bekommen, gibt es eine Reihe verschiedener Verfahren, die hier kurz erwähnt werden sollen. Im Anschluß daran werden die Überlegungen beschrieben, die es uns gestatten, bei vorgegebener Meßfehlerverteilung das Verfahren mit dem kleinsten Fehler für die zu errechnenden Konzentrationen zu konstruieren.

4.1. Die Auswertung der Extinktionskurven an N ausgewählten Wellenlängen

Um die Konzentrationen x_ν zu errechnen, genügt es, wenn man die Extinktionswerte an N verschiedenen Wellenlängen kennt, für die die Determinante von folgender Matrix

$$H(\lambda_1,\lambda_2,\ldots\lambda_N) = \begin{pmatrix} \varphi_1(\lambda_1), \varphi_2(\lambda_1), \ldots \varphi_N(\lambda_1) \\ \varphi_1(\lambda_2), \varphi_2(\lambda_2), \ldots \varphi_N(\lambda_2) \\ \vdots \\ \varphi_1(\lambda_N), \varphi_2(\lambda_N), \ldots \varphi_N(\lambda_N) \end{pmatrix} \qquad (4.6)$$

ungleich Null ist. Betrachtet man die Gleichung

$$y(\lambda) = \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) \qquad [4.4]$$

für die N verschiedenen Wellenlängen $\lambda_1, \lambda_2, \ldots \lambda_N$, so erhält man das Gleichungssystem

$$H \underline{x} = \underline{y} \; . \qquad (4.7)$$

$$\underline{x} = \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ . \\ . \\ x_N \end{pmatrix} \qquad (4.8)$$

ist der Spaltenvektor aus den gesuchten Konzentrationen.

$$\underline{y} = (y(\lambda_1), y(\lambda_2), \ldots, y(\lambda_N)) \qquad (4.9)$$

ist der Zeilenvektor aus den gemessenen Extinktionswerten. Da wir die Wellenlängen so wählten, daß die Determinante der Matrix H ungleich Null ist, so können wir die inverse Matrix H^{-1} bilden. Wir erhalten für die gesuchten Konzentrationen die Beziehung

$$\underline{x} = H^{-1} \underline{y} \; . \qquad (4.10)$$

4.2. Die Ausgleichsrechnung nach der Methode der kleinsten Quadrate von Gauß als ein Spezialfall der Orthogonalitätsmethode[1)]

Lübbers,D. und W.Niesel[63] haben angeregt, alle gemessenen Extinktionswerte der Rapidspektrophotometerkurven zur Auswertung heranzuziehen und eine Ausgleichsrechnung im Sinne der Methode der kleinsten Quadrate von Gauß vorzunehmen. Man fordert, daß die gemessene Kurve $y(\lambda)$ im Mittel möglichst gut mit der aus den Grundkomponenten $\varphi_\nu(\lambda)$ konstruierten Kurve $\sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda)$ übereinstimmt. Als Formel lautet die Forderung

$$\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \left(y(\lambda) - \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) \right)^2 d\lambda = \text{Min.} \qquad (4.11)$$

Die notwendigen Bedingungen für ein Minimum sind, daß die partiellen Ableitungen nach den x_ν verschwinden. Wir erhalten

$$\frac{\partial}{\partial x_\mu} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \left(y(\lambda) - \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) \right)^2 d\lambda = 0 ,$$

$$\mu = 1 \text{ bis } N. \qquad (4,12)$$

Die Ausrechnung ergibt

$$\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \varphi_\mu(\lambda) \left(y(\lambda) - \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) \right) d\lambda = 0, \quad \mu = 1 \text{ bis } N. \qquad (4.13)$$

Durch Umformung dieser Bedingungsgleichungen erhält

[1)] Der Ausdruck wurde in Analogie zu Poloshi[85], VII.Kapitel gewählt.

man das folgende lineare Gleichungssystem für die Größen x_ν

$$\sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \varphi_\mu(\lambda)\, \varphi_\nu(\lambda)\, d\lambda = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \varphi_\mu(\lambda)\, y(\lambda)\, d\lambda,$$

$$\mu = 1 \text{ bis } N . \qquad (4.14)$$

Die Gleichung (4.13) bedeutet, daß die Fehlerfunktionen

$$v(\lambda) = y(\lambda) - \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu\, \varphi_\nu(\lambda) \qquad (4.15)$$

orthogonal zu den Funktionen $\varphi_\nu(\lambda)$ sind. Wir haben damit gezeigt, daß es sich um einen Spezialfall der Orthogonalitätsmethode handelt. Die Orthogonalitätsmethode der Ausgleichsrechnung besteht darin, daß man verlangt, daß die Fehlerfunktion $v(\lambda)$ orthogonal zu N linear unabhängigen Funktionen

$$\hat{\psi}_1,\ \hat{\psi}_2,\ \ldots,\ \hat{\psi}_N(\lambda) \qquad (4.16)$$

ist. Das heißt

$$\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \hat{\psi}_\mu(\lambda) \left(y(\lambda) - \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu\, \varphi_\nu(\lambda) \right) d\lambda = 0 , \qquad (4.17)$$

$$\mu = 1 \text{ bis } N .$$

Diese Bedingung liefert das lineare Gleichungssystem

$$\sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \hat{\psi}_\mu(\lambda)\, \varphi_\nu(\lambda)\, d\lambda = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \hat{\psi}_\mu(\lambda)\, y(\lambda)\, d\lambda,$$

$$\mu = 1 \text{ bis } N , \qquad (4.18)$$

für die unbekannten Größen x_ν . Übersichtlicher wird das Gleichungssytem, wenn man eine abgekürzte Schreibweise

für das skalare Produkt

$$(u,v) = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} u(\lambda)\, v(\lambda)\, d\lambda \qquad (4.19)$$

zweier Funktionen u und v benutzt. Dann lautet das System (4.18)

$$\sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \, (\hat{\psi}_\mu, \varphi_\nu) = (\hat{\psi}_\mu, y) \, , \qquad (4.20)$$

$$\mu = 1 \text{ bis } N.$$

Als Matrix A bezeichnen wir die Matrix mit den Elementen

$$A_{\mu\nu} = (\hat{\psi}_\mu, \varphi_\nu) \, . \qquad (4.21)$$

Der Spaltenvektor

$$\underline{x} = \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ x_N \end{pmatrix} \, , \qquad (4.22)$$

der die gesuchten Konzentrationen enthält, werde zur Abkürzung als $\underline{x}$ eingeführt. Eine entsprechende Abkürzung wählen wir für den Spaltenvektor

$$\begin{pmatrix} (\hat{\psi}_1, y) \\ (\hat{\psi}_2, y) \\ (\hat{\psi}_3, y) \\ \cdot \\ \cdot \\ (\hat{\psi}_N, y) \end{pmatrix} = \underline{(\hat{\psi}, y)} \, . \qquad (4.23)$$

Damit ergibt sich für das Gleichungssystem (4.18) die Form

$$A\,\underline{x} = (\underline{\hat{\psi}}, y) \,. \qquad (4.24)$$

Ist die Determinante von A nicht Null, so können wir das Gleichungssystem nach $\underline{x}$ auflösen. Wir erhalten

$$\underline{x} = A^{-1}\,(\underline{\hat{\psi}}, y) \,. \qquad (4.25)$$

Die Matrix A^{-1} mit den Elementen $(A^{-1})_{ij}$ ist die inverse Matrix zu A. Mit dem gemessenen Summenspektrum müssen die N inneren Produkte

$$(\underline{\hat{\psi}}, y) = \begin{pmatrix} (\hat{\psi}_1, y) \\ (\hat{\psi}_2, y) \\ \cdot \\ \cdot \\ (\hat{\psi}_N, y) \end{pmatrix} \qquad [4.23]$$

gebildet werden. N verschiedene Linearkombinationen dieser Werte ergeben die gesuchten Konzentrationen

$$\begin{aligned} x_1 &= (A^{-1})_{11}(\hat{\psi}_1,y)+(A^{-1})_{12}(\hat{\psi}_2,y)+\ldots(A^{-1})_{1N}(\hat{\psi}_N,y)\,, \\ &\cdot \\ &\cdot \\ x_N &= (A^{-1})_{N1}(\psi_1,y)+(A^{-1})_{N2}(\hat{\psi}_2,y)+\ldots(A^{-1})_{NN}(\hat{\psi}_N,y)\,. \end{aligned} \qquad (4.26)$$

Die zuerst beschriebene N Punkte-Methode ist, wie das Auswertverfahren nach dem Prinzip der kleinsten Quadrate von Gauß, ein Spezialfall der Orthogonalitätsmethode. Um die Ergebnisse der N Punkte-Methode zu bekommen, wähle man für die $\hat{\psi}$-Funktion die δ-Funktionen

$$\hat{\psi}_\mu(\lambda) = \delta(\lambda - \lambda_\mu)\,, \quad \mu = 1 \text{ bis } N\,. \qquad (4.27)$$

4.3. Die Teilgebietsmethode [1]

Auch die Teilgebietsmethode ist ein Spezialfall der Orthogonalitätsmethode. Man teilt das gemessene Wellenlängenintervall λ_1 bis λ_2 in N Teilintervalle

$$\lambda_I = \lambda_1,\ \lambda_{II},\ \lambda_{III},\ \ldots,\ \lambda_{N+I} = \lambda_2 . \qquad (4.28)$$

Es wird gefordert, daß das Integral über die Fehlerfunktion $v(\lambda)$ in jedem dieser Teilintervalle verschwindet. Das heißt

$$\begin{aligned}
&\int_{\lambda_I}^{\lambda_{II}} \Big(y(\lambda) - \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi(\lambda) \Big)\, d\lambda = 0 ,\\
&\int_{\lambda_{II}}^{\lambda_{III}} \Big(y(\lambda) - \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi(\lambda) \Big)\, d\lambda = 0 ,\\
&\qquad\vdots\\
&\int_{\lambda_N}^{\lambda_{N+I}} \Big(y(\lambda) - \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi(\lambda) \Big)\, d\lambda = 0 .
\end{aligned} \qquad (4.29)$$

Das entspricht einer Wahl eines Systems von Rechteckfunktionen

$$\hat{\varphi}_\mu(\lambda) = \begin{cases} 0 \text{ für } & \lambda < \lambda_\mu , \\ 1 \text{ für } & \lambda_\mu \leqq \lambda \leqq \lambda_{\mu+I} , \\ 0 \text{ für } & \lambda_{\mu+I} \leqq \lambda \end{cases} \qquad (4.30)$$

bei der Orthogonalitätsmethode.

Diese Teilgebietsmethode sei als ein Beispiel einer Methode erwähnt, bei der die Funktionen $\hat{\varphi}_\mu(\lambda)$ einen sehr einfachen Verlauf haben. Es handelt sich um eine Methode, die auch ohne Rechenmaschinen an aufgezeichneten

[1] Der Ausdruck wurde in Analogie zu Poloski[85], VII.Kapitel gewählt.

Spektren anwendbar ist.

Die Teilgebietsmethode hat ferner die Vorteile, daß sie relativ gut anwendbar ist, wenn die Grundfunktionen $\varphi_\nu(\lambda)$ nur als grobe Verlaufsform ohne sehr genaue Wellenlängenzuordnung bekannt sind. Man braucht nur die Integrale der Grundfunktionen über die entsprechenden Teilintervalle. Die Teilgebietsmethode benötigt außerdem relativ wenig Rechenzeit. Es würde möglich sein, auf der PDP8 nach mindestens vier Komponenten während der fortlaufenden Messung auszuwerten. Haben die Grundkomponenten weitgehend isolierte Absorptionsbanden, so ist die Einbuße an Genauigkeit gegenüber den anderen beschriebenen Methoden nur relativ gering.

Nachdem wir jetzt verschiedene Auswertverfahren kennengelernt haben, kommen wir auf die wesentliche Frage. Bei welchem Auswertverfahren ist der für die errechneten Konzentrationen zu erwartende Fehler ein Minimum. Offenbar beschreibt die Orthogonalitätsmethode ein relativ allgemein gehaltenes Auswertverfahren. Wir haben versucht, die zu erwartenden Fehler für die errechneten Konzentrationen als Funktionale der N linear unabhängigen Funktionen $\hat{\varphi}_\nu(\lambda)$ zu errechnen, um dann mit den Methoden der Variationsrechnung die optimalen Funktionen $\hat{\varphi}_\nu(\lambda)$ zu bestimmen. Diese Versuche waren nur von teilweisem Erfolg gekrönt; denn wir mußten zu starke Vereinfachungen vornehmen, um die Ausdrücke so zu reduzieren, daß man mit ihnen rechnen konnte.

Aus diesen Gründen haben wir einen anderen Weg beschritten, den wir im folgenden mit den Begriffsbildungen der

Hilbertraumanalysis darstellen.

4.4. Das Verfahren mit kleinsten Fehlern für die errechneten Konzentrationen

Man weiß, daß Funktionen, die im Lebesgueschen Sinne quadratisch summierbar sind, den Axiomen des Hilbertschen Raumes genügen, wenn man die Metrik des Raumes durch ein Skalarprodukt der Form

$$(f,g) = \left(\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \alpha(\lambda)\, d\lambda \right)^{-1} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} f(\lambda) \cdot g(\lambda) \alpha(\lambda)\, d\lambda \quad (4.31)$$

festlegt.[92] Wir beschränken uns auf einen reellen Raum mit reellen Elementen f und g, denen eine reelle Zahl (f,g) als Skalarprodukt zugeordnet wird. Die Funktion $\alpha(\lambda) \geqq 0$ ist eine Belegfunktion, deren Bedeutungen wir in den folgenden Ausführungen noch genauer erläutern. Der Wellenlängenbereich λ_1, λ_2 ist der Bereich, in dem wir die Spektren $y(\lambda)$ messen. Wir denken uns die Spektren mit dem mutmaßlichen Fehler $F(\lambda)$ behaftet. Wir nehmen mit Hilfe der Funktion $\alpha(\lambda)$ eine Dehnung beziehungsweise eine Stauchung des Raumes vor, und zwar in der Weise, daß wir

$$\alpha(\lambda) = \frac{1}{F^2(\lambda)} \quad (4.32)$$

setzen. Die Rechtfertigung für diese Wahl von $\alpha(\lambda)$ ergibt sich erst aus den späteren Ausführungen.

Mit Hilfe des Skalarproduktes ist in dem Hilbert-Raum auf folgende Weise eine Norm

$$\| f \| = \sqrt{(f, f)} \qquad (4.33)$$

bestimmt.

Wir wollen jetzt zeigen, wie die Konzentrationen x_ν von den gemessenen Spektren $y(\lambda)$ abhängen. Dazu benötigen wir den Begriff des linearen Funktionals im Hilbert-Raum.[92]

Ein lineares Funktional ist eine Vorschrift, die jedem Element g des Raumes eine Zahl $Q[g]$ zuordnet, wobei folgende Gesetzmäßigkeiten bestehen müssen. Das Funktional muß

1.) additiv sein, das heißt, $Q[g + f] = Q[g] + Q[f]$, (4.35a)

2.) homogen sein, das heißt, $Q[ag] = a\,Q[g]$ für alle Zahlen a, (4.35b)

3.) beschränkt sein, das heißt, es muß eine Größe M existieren derart, daß für alle g

$$\left| Q[g] \right| \leq M \| g \| \qquad (4.35c)$$

erfüllt ist.

Wir behaupten, daß die Konzentrationen x_ν lineare Funktionale der gemessenen Spektren $y(\lambda)$ sind.

Die Additivität und Homogenität folgen aus der angenommenen multiplikativen Farbmischung oder, genauer gesagt, aus der Beziehung

$$y(\lambda) = \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) \,. \qquad [4.4]$$

Addieren wir zwei Sätze von Konzentrationen, so addieren sich auch die Spektren.

Ein mit einem Faktor multipliziertes Spektrum ist nur

so zu deuten, daß alle Konzentrationen um diesen Faktor vermehrt werden.

Etwas schwieriger ist die Beschränktheit nachzuweisen. Wir quadrieren die Gleichung (4.4) auf beiden Seiten und integrieren mit der Belegfunktion $\alpha(\lambda)$ über den Bereich λ_1, λ_2. Wir erhalten

$$\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} y^2(\lambda)\alpha(\lambda)\,d\lambda = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2}\left(\sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda)\right)^2 \alpha(\lambda)\,d\lambda \tag{4.36}$$

oder

$$\|y\|^2 = \left(\int_{\lambda_1}^{\lambda_2}\alpha(\lambda)d\lambda\right)^{-1}\int_{\lambda_1}^{\lambda_2}\left(\sum_{\nu=1}^{N} x_\nu\varphi_\nu(\lambda)\right)^2\alpha(\lambda)\,d\lambda. \tag{4.37}$$

Auf der rechten Seite lassen wir in der Summe unter dem zweiten Integral alle Summanden bis auf den ν-ten Summanden fort. Wir erhalten, da nur positive Größen vorkommen, die Abschätzung

$$\|y\|^2 = \left(\int_{\lambda_1}^{\lambda_2}\alpha(\lambda)d\lambda\right)^{-1}\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} x_\nu^2\varphi_\nu^2(\lambda)\,\alpha(\lambda)\,d\lambda \tag{4.38}$$

oder

$$\|y\|^2 \geq x_\nu^2\|\varphi_\nu\|^2 . \tag{4.39}$$

Daraus folgt

$$x_\nu \leq \frac{1}{\|\varphi_\nu\|}\,\|y\| . \tag{4.40}$$

Es ist uns gelungen, gemäß der Bedingung (4.35c) eine Schranke

$$M = \frac{1}{\|\varphi_\nu\|} \tag{4.41}$$

zu finden. Damit ist auch die Beschränktheit der Funktionale bewiesen. Wir haben gezeigt, daß es sich bei den Konzentrationen um lineare Funktionale der gemessenen Spektren handelt.

Im Hilbert-Raum gilt der sehr wichtige Satz von M.Fréchet und F.Riesz:[92,138]

Jedes lineare Funktional $Q[y]$ im Hilbert-Raum H läßt sich eindeutig durch die Gleichung

$$Q[y] = (y,g) \tag{4.42}$$

darstellen, und die erzeugende Funktion $g(\lambda)$ ist durch das Funktional eindeutig bestimmt.

Damit haben wir das wichtige Resultat:

Wie auch immer das Auswertverfahren beschaffen sein sollte, wenn es der Tatsache Rechnung trägt, daß die Konzentrationen lineare Funktionale der gemessenen Spektren sind, so müssen sich die Konzentrationen als

$$x_\nu = \left(\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \alpha(\lambda)\,d\lambda\right)^{-1} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} y(\lambda)\hat{g}_\nu(\lambda)\,\alpha(\lambda)\,d\lambda, \qquad \nu = 1 \ldots N, \tag{4.43}$$

darstellen lassen. In der Symbolik des Hilbert-Raumes erhält man

$$x_\nu = (y, \hat{g}_\nu), \qquad \nu = 1 \ldots N. \tag{4.44}$$

Die Konzentrationen ergeben sich als das Skalarprodukt der gemessenen Funktion $y(\lambda)$ mit einer Funktion $\hat{g}_\nu(\lambda)$.

Dieses Resultat steht im Einklang mit den im Anfang dieses Kapitels gebrachten Beispielen für Auswertverfahren.

Verschiedene Auswertverfahren unterscheiden sich durch verschiedene Funktionen $\hat{g}_\nu(\lambda)$.

Wir versuchen jetzt eine möglichst allgemeine Form für die Funktionen $\hat{g}_\nu(\lambda)$ zu finden. Dazu bilden wir auf beiden Seiten der Gleichung

$$\sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) = y(\lambda) \qquad [4.4]$$

das Skalarprodukt mit einer Funktion $\hat{g}_\mu$, die der Bedingung

$$x_\mu = (y, \hat{g}_\mu) \qquad (4.45)$$

genügt. $\hat{g}_\mu$ charakterisiert ein noch nicht weiter bestimmtes Auswertverfahren. So folgt aus (4.4)

$$\sum_{\nu=1}^{N} x_\nu (\varphi_\nu, \hat{g}_\mu) = (y, \hat{g}_\mu) \qquad (4.46)$$

oder

$$\sum_{\nu=1}^{N} x_\nu (\varphi_\nu, \hat{g}_\mu) = x_\mu . \qquad (4.47)$$

Da die Beziehung für jede Wahl der Konzentrationen x_1 bis x_N richtig sein soll, muß

$$(\varphi_\nu, \hat{g}_\mu) = 0 \quad \text{für} \quad \nu \neq \mu \qquad (4.48)$$

und

$$(\varphi_\nu, \hat{g}_\mu) = 1 \quad \text{für} \quad \nu = \mu \quad \text{sein.} \qquad (4.49)$$

$g_\mu(\lambda)$ muß senkrecht zu dem durch die Funktionen $\varphi_\nu(\lambda)$ mit $\nu \neq \mu$ aufgespannten Teilraum sein. Die Projektion von $\hat{g}_\mu(\lambda)$ auf $\varphi_\mu(\lambda)$ muß 1 sein. Über das Verhalten in dem durch die Funktionen $\varphi_\nu(\lambda)$ (ν = 1 bis N) bestimmten orthogonalen Komplementärraum des Hilbert-Raumes wird

nichts gefordert. Verschiedene Auswertverfahren unterscheiden sich durch die Anteile der Funktionen $\hat{g}_\mu$ in diesem Komplementärraum.

Wir können jetzt sagen, daß man mit der oben beschriebenen Orthogonalitätsmethode jedes mögliche Auswertverfahren bekommen kann. Da man stets für die Konzentrationen Ausdrücke der Form

$$x_\nu = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} y(\lambda)\, \hat{g}_\nu(\lambda)\alpha(\lambda)\, d\lambda, \quad \nu = 1 .. N, \qquad (4.50)$$

erhält, so entspricht dies einem Auswertverfahren mit der Orthogonalitätsmethode, bei der zum Beispiel die linear unabhängigen Funktionen

$$\hat{\Psi}_\nu(\lambda) = \alpha(\lambda)\, \hat{g}_\nu(\lambda)\left(\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \alpha(\lambda)\, d\lambda \right)^{-1}, \quad \nu = 1 \ldots N, \qquad (4.51)$$

benutzt werden. Verschiedene Sätze von Funktionen $\hat{\Psi}_\nu$ können zu den gleichen Ausdrücken (4.50) für die Konzentrationen x_ν führen.

Aus einem beliebigen Element des Hilbert-Raumes versuchen wir eine Funktion $\hat{g}_\mu$ zu konstruieren, indem wir die Projektion auf den durch die Funktionen φ_ν mit $\nu \neq \mu$ aufgespannten Teilraum abziehen.

Nach dem Orthonormierungsverfahren von E.Schmidt[92] orthonormieren wir uns N-1 Funktionen φ_ν mit $\nu \neq \mu$ schrittweise. Wir bilden

$$\overline{\varphi_1} = \frac{\varphi_1}{\| \varphi_1 \|}, \qquad (4.52)$$

$$\overline{\varphi_2} = \frac{\varphi_2 - (\varphi_2, \overline{\varphi_1})\,\overline{\varphi_1}}{\left\| \varphi_2 - (\varphi_2, \overline{\varphi_1})\,\overline{\varphi_1} \right\|} , \qquad (4.53)$$

.

.

$$\overline{\varphi_\nu} = \frac{\varphi_\nu - \sum_{i=1}^{\nu-1} (\varphi_\nu, \overline{\varphi_i})\,\overline{\varphi_i}}{\left\| \varphi_\nu - \sum_{i=1}^{\nu-1} (\varphi_\nu, \overline{\varphi_i})\,\overline{\varphi_i} \right\|} . \qquad (4.54)$$

Die Funktionen $\overline{\varphi_\nu}$ mit $\nu \neq \mu$ spannen den gleichen Teilraum L des gesamten Hilbert-Raumes H auf wie die Funktionen φ_ν mit $\nu \neq \mu$.

Es gilt im Hilbert-Raum der Satz:[138]

Es sei U ein Unterraum des Hilbert-Raumes H, dann läßt sich jedes Element $x \in H$ eindeutig in der Form $x=y+z$ mit $y \in U$, $z \perp U$ darstellen.

Wenden wir diesen Satz auf unser Element f an, so gilt

$$f = f_M + f_L \qquad (4.55)$$

mit $f_M \perp L$ und $f_L \in L$. (4.56)

Da wir für den Unterraum L ein orthonormiertes Sytem $\overline{\varphi_\nu}$ mit $\nu \neq \mu$ nach dem Verfahren von E.Schmidt konstruiert haben, läßt sich f_L wie folgt darstellen

$$f_L = \sum_{\nu=1}^{N} (f, \overline{\varphi_\nu})\,\overline{\varphi_\nu} \quad \text{mit } \nu \neq \mu \qquad (4.57)$$

oder

$$f_M = f - \sum_{\nu=1}^{N} (f, \overline{\varphi_\nu})\,\overline{\varphi_\nu} \quad \text{mit } \nu \neq \mu . \qquad (4.58)$$

Das Skalarprodukt $(f, \overline{\varphi_\nu})\,\overline{\varphi_\nu}$ ist die Projektion des

Elementes f auf die Basiselemente $\overline{\varphi_\nu}$. f_M ist die allgemeinste Form für ein Element, das für die weiteren Überlegungen die notwendige Bedingung $f_M \perp L$ erfüllt.

Wenn wir die Gleichung

$$\sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu = y \qquad [4.4]$$

auf beiden Seiten skalar mit der Funktion f_M multiplizieren, erhalten wir, da $f_M \perp L$, die Beziehung

$$x_\mu (\varphi_\mu, f_M) = (y, f_M) . \qquad (4.59)$$

Wir müssen für f_M noch zusätzlich fordern, daß

$$(\varphi_\mu, f_M) \neq 0 , \qquad (4.60)$$

dann erhalten wir

$$x_\mu = \frac{(y, f_M)}{(\varphi_\mu, f_M)} . \qquad (4.61)$$

Diese Beziehung beschreibt die allgemeinste Form einer Auswertung nach der Konzentration x_μ. Man bedenke dabei, daß wir von einem beliebigen Element f ausgegangen sind, für das das zughörige f_M der Bedingung $(\varphi_\mu, f_M) \neq 0$ genügen muß. Um das Auswertverfahren mit dem kleinsten Fehler $|\Delta x_\mu|_{Min}$ zu finden, konstruieren wir uns als nächstes die Funktionen

$$\psi_\mu = \varphi_\mu - \sum_{\nu=1}^{N} (\varphi_\mu, \overline{\varphi_\nu})\, \overline{\varphi_\nu} \quad \text{mit} \quad \nu \neq \mu . \qquad (4.62)$$

Das Element ψ_μ kann nicht das Nullelement sein; denn das würde bedeuten, daß φ_μ nicht linear unabhängig von den übrigen φ_ν ist. Die lineare Unabhängigkeit der Funk-

tionen φ_ν mit $\nu = 1 \ldots N$ müssen wir fordern, um eine eindeutige Analyse der Summenspektren vornehmen zu können. Aus (4.62) folgt, ψ_μ ist orthogonal zu allen $\overline{\varphi_\nu}$ mit $\nu \neq \mu$, und damit folgt

$$(\varphi_\mu, \psi_\mu) = (\psi_\mu, \psi_\mu) \; . \tag{4.63}$$

Wir benutzen noch einmal den oben zitierten Satz über die orthogonale Zerlegung eines Elementes x des Hilbert-Raumes in der Form x=y+z mit $y \in U$ und $z \perp U$. Als Unterraum U des Hilbert-Raumes wählen wir den eindimensionalen Raum, der durch das Element ψ_μ aufgespannt wird. Wir können somit für f_M die folgende Summe

$$f_M = \varsigma \psi_\mu + \eta \, f_o \tag{4.64}$$

schreiben. Dabei ist

$$(\psi_\mu, f_o) = 0 \; . \tag{4.65}$$

Nach (4.64) gilt

$$\eta \, f_o = f_M - \varsigma \psi_\mu \; . \tag{4.66}$$

f_M ist wegen (4.58) und ψ_μ ist wegen (4.62) orthogonal zu den Elementen $\overline{\varphi_\nu}$ mit $\nu \neq \mu$. Folglich ist auch f_o orthogonal zu allen $\overline{\varphi_\nu}$ mit $\nu \neq \mu$. Hieraus, aus (4.65), und aus der aus (4.62) hergeleiteten Gleichung

$$\varphi_\mu = \psi_\mu + \sum_{\nu=1}^{N} (\varphi_\mu, \overline{\varphi_\nu}) \, \overline{\varphi_\nu} \quad \text{mit} \quad \nu \neq \mu \tag{4.67}$$

folgt, daß

$$(\varphi_\mu, f_o) = 0 \tag{4.68}$$

sein muß.

Wir wollen zeigen, daß im Ausdruck

$$f_M = \varsigma\, \psi_\mu + \eta\, f_o \qquad [4.64]$$

der Faktor $\varsigma \neq 0$ sein muß. Dazu bilden wir das Skalarprodukt

$$(\varphi_\mu, f_M) = \varsigma\,(\varphi_\mu, \psi_\mu) + \eta\,(\varphi_\mu, f_o)\,. \qquad (4.69)$$

Mit den Beziehungen (4.63) und (4.68) erhalten wir

$$(\varphi_\mu, f_M) = \varsigma\,(\psi_\mu, \psi_\mu). \qquad (4.70)$$

Nach (4.60) ist die linke Seite nicht Null, folglich darf auch die rechte Seite nicht Null sein, also ist $\varsigma \neq 0$.

Jetzt sind wir mit den Überlegungen so weit, daß wir die bei der Konzentrationsberechnung auftretenden Fehler betrachten können, um dann daraus das Verfahren mit dem kleinsten zu erwartenden Fehler zu konstruieren.

Wir betrachten dazu zuerst den endlich dimensionalen Fall, wie er h im Rapidspektrophotometer vorliegt. Für einen nur M dimensionalen Raum gelten alle hergeleiteten Beziehungen, nur daß man im Skalarprodukt (4.31) die Integrale durch Summen zu ersetzen hat. Das entsprechende Skalarprodukt lautet also

$$(f,g) = \left(\sum_{i=1}^{M} \alpha_i\right)^{-1} \sum_{i=1}^{M} f_i\, g_i\, \alpha_i\,. \qquad (4.71)$$

Beim Rapidspektrophotometer besteht das gemessene Spektrum $y(\lambda)$ aus $M = 227$ Meßwerten. Wie aus der Beschreibung des Rapidspektrophotometers im 2.Kapitel hervorgeht, handelt es sich dabei um weitgehend voneinander

unabhängige Messungen. Wir können daher annehmen, daß wir es mit statistisch verteilten Fehlern F_i zu tun haben, für die das Gaußsche Fehlerfortpflanzungsgesetz anwendbar ist. Aus (4.61) und (4.71) erhalten wir mit der Annahme, daß die Meßwerte y_i mit den Fehlern $|F_i|$ behaftet sind, den Ausdruck

$$x_\mu = \frac{(y, f_M)}{(\varphi_\mu, f_M)} \pm \frac{\left(\sum_{i=1}^{M} F_i^2 \, f_{M_i}^2 \, \alpha_i^2 \right)^{1/2}}{(\varphi_\mu, f_M) \sum_{i=1}^{M} \alpha_i} \,. \tag{4.72}$$

In Analogie zu (4.3) gilt für den endlich dimensionalen Raum

$$\alpha_i = \frac{1}{F_i^2} \,. \tag{4.73}$$

Aus (4.72) und (4.73) folgt für den Fehler der Konzentration x_μ der Ausdruck

$$|\Delta x_\mu| = \frac{\left(\sum_{i=1}^{M} f_{M_i}^2 \, \alpha_i \right)^{1/2}}{(\varphi_\mu, f_M) \sum_{i=1}^{M} \alpha_i} \,. \tag{4.74}$$

Unter Verwendung der Abkürzung für die Norm (4.33) erhalten wir

$$|\Delta x_\mu| = \frac{\| f_M \|}{(\varphi_\mu, f_M) \left(\sum_{i=1}^{M} \alpha_i \right)^{1/2}} \,. \tag{4.75}$$

Will man den Fehler für kontinuierlich gemessene Spektren ermitteln, so tritt das Probelm auf, der Größe

$$\left(\sum_{i=1}^{M} \alpha_i \right)^{1/2} = M_\alpha \qquad (4.76)$$

einen Wert zuzuordnen. Wir können für diesen Ausdruck schreiben

$$M_\alpha = \left(\frac{M}{\lambda_2 - \lambda_1} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \alpha(\lambda)\, d\lambda \right)^{1/2} . \qquad (4.77)$$

Der Ausdruck enthält aber noch die Zahl der unabhängigen Messungen M, die das Spektrum enthält. Aus den Gegebenheiten des betrachteten Photometers und den damit gemessenen Spektren muß man eine Abschätzung für den Wert M treffen. Er richtet sich zum Beispiel danach, wie weit über das Rauschen und ähnliche Fehler bereits integriert wird oder welche Frequenzen die benutzten Verstärker und Registriergeräte noch erfassen.

Andererseits wird es vielfach möglich sein, dem Ausdruck

$$M_\alpha = \left(\sum_{i=1}^{M} \alpha_i \right)^{1/2} \qquad [4.76]$$

als Ganzes einen Wert zuzuordnen. Das Rapidspektrophotometer eignet sich besonders gut für derartige Fehlerbetrachtungen; denn dort haben wir es mit weitgehend getrennten Messungen zu tun. Denken wir uns die Zahl der Meßwerte M im Rapidspektrophotometer erhöht, so werden auch die zu erwartenden Fehler für die einzelnen Meßwerte ansteigen. Aus der Beziehung (4.73) folgt, daß dann die Werte α_i kleiner werden. So ist es denkbar, daß der Ausdruck M_α kaum oder gar nicht von M abhängt.

Für die Konstruktion des Auswertverfahrens mit dem kleinsten zu erwartenden Fehler spielt das eben erörterte Problem keine Rolle; denn der Wert M_α ist ein charakteristischer Wert für das verwandte Photometer, aber nicht für das benutzte Auswertverfahren.

Wir betrachten den aus (4.75) und aus (4.76) folgenden Audruck

$$|\Delta x_\mu| = \frac{\|f_M\|}{(\psi_\mu, f_M)\, M_\alpha} \,. \tag{4.78}$$

Für das Element f_M haben wir die orthogonale Zerlegung

$$f_M = \varrho\, \psi_\mu + \eta\, f_o \tag{4.64}$$

angegeben. Im Hilbert-Raum gilt der verallgemeinerte Satz des Pythagoras[92,138], so daß

$$\|f_M\|^2 = \varrho^2 \|\psi_\mu\|^2 + \eta^2 \|f_o\|^2. \tag{4.79}$$

Wie setzen diesen Ausdruck in die Beziehung (4.78) ein und erhalten

$$|\Delta x_\mu| = \frac{(\varrho^2 \|\psi_\mu\|^2 + \eta^2 \|f_o\|^2)^{1/2}}{(\psi_\mu, f_M)\, M_\alpha} \,. \tag{4.80}$$

Wenn wir den Nenner mit (4.70) umformen, dann erhalten wir

$$|\Delta x_\mu| = \frac{1}{M_\alpha} \left(\frac{1}{\|\psi_\mu\|^2} + \frac{\eta^2}{\varrho^2} \frac{\|f_o\|^2}{\|\psi_\mu\|^4} \right)^{1/2} , \tag{4.81}$$

$$|\Delta x_\mu| = \frac{1}{M_\alpha \|\psi_\mu\|} \left(1 + \frac{\eta^2}{\varrho^2} \frac{\|f_0\|^2}{\|\psi_\mu\|^2}\right)^{1/2}. \qquad (4.82)$$

Für jedes Auswertverfahren läßt sich ein Fehler in dieser Form angeben. Man erkennt auch ohne Differentialrechnung, daß der kleinste Fehler dann auftritt, wenn wir den Parameter $\eta = 0$ wählen beziehungsweise für f_0 das Nullelement wählen. Unter diesen Annahmen hängt der Fehler nicht von ϱ ab.

Wir haben damit das Auswertverfahren gefunden mit dem kleinsten zu erwartenden Fehler

$$|\Delta x_\mu|_{\text{Min}} = \frac{1}{M_\alpha \|\psi_\mu\|} \qquad (4.83)$$

für die Konzentration x_μ. Schreiben wir die Norm $\|\psi_\mu\|$ als Integral, so erhalten wir

$$|\Delta x_\mu|_{\text{Min}} = \frac{1}{M_\alpha} \left(\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \alpha(\lambda) d\lambda\right)^{1/2} \left(\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \psi_r^2(\lambda) \alpha(\lambda) d\lambda\right)^{-1/2}. \qquad (4.84)$$

Es ist für die Rechnungen äußerst zweckmäßig, die Belegfunktion

$$\alpha(\lambda) = \frac{1}{F^2(\lambda)} \qquad [4.32]$$

zu wählen, denn damit gelingt es, in (4.78) den Zähler als Norm zu schreiben, und wir konnten dann den auf den Hilbert-Raum verallgemeinerten Satz des Pythagoras anwenden. Wie man sich überlegen kann, führen verschiedene Belegfunktionen $\alpha(\lambda)$ nicht zu ganz verschiedenen

Auswertverfahren, sondern bei einer anderen Wahl von $\alpha(\lambda)$ muß man nur von einem anderen Element f ausgehen, um zu einem entsprechenden Ausdruck für die Konzentration x_μ zu gelangen. Dieser Sachverhalt ist insofern wichtig, weil wir sonst nicht behaupten könnten, daß (4.82) die allgemeinste Form des Fehlers darstellt.

Das hier gefundene "optimale" Auswertverfahren ergibt zur Berechnung der Konzentration x_μ den Ausdruck

$$x_\mu = \frac{(y, f_M)}{(\varphi_\mu, f_M)} , \qquad [4.61]$$

wobei wir

$$f_M = \varphi_\mu \qquad (4.85)$$

zu setzen haben. Mit (4.63) folgt

$$x_\mu = \frac{(y, \varphi_\mu)}{\|\varphi_\mu\|^2} \qquad (4.86)$$

Wir setzen zur Abkürzung

$$h_\mu = \frac{\varphi}{\|\varphi_\mu\|^2} , \qquad (4.87)$$

damit erhalten wir

$$x_\mu = (y, h_\mu) . \qquad (4.88)$$

Mit der Formel (4.31), mit der das Skalarprodukt definiert wurde, ergibt sich

$$x_\mu = \left(\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \alpha(\lambda) d\lambda \right)^{-1} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} y(\lambda) h_\mu(\lambda) \alpha(\lambda) d\lambda . \qquad (4.89)$$

Kennt man die Funktion $h_\mu(\lambda)$, so kennt man auch

$$g_\mu(\lambda) = \left(\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \alpha(\lambda) d\lambda \right)^{-1} h_\mu(\lambda) \alpha(\lambda) . \qquad (4.90)$$

Damit erhalten wir für die Auswertung nach der μ.Komponente den Ausdruck

$$x_\mu = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} y(\lambda)\, g_\mu(\lambda)\, d\lambda . \qquad (4.91)$$

Die Berechnung der Funktionen Ψ_μ

Die Funktion Ψ_μ ist, in der Geometrie des Hilbert-Raumes gesprochen, gleich der Komponente von φ_μ, die orthogonal zu dem durch die φ_ν mit $\nu \neq \mu$ aufgespannten Teilraum ist. Damit ist auch der Weg zur Berechnung der Funktion Ψ_μ vorgezeichnet. Die Funktion Ψ_μ berechnen wir aus den Grundkomponenten φ_ν sukzessiv nach dem Orthonormierungsverfahren von E.Schmidt

$$\overline{\varphi_1} = \frac{\varphi_1}{\| \varphi_1 \|} , \qquad [4.52]$$

$$\overline{\varphi_\nu} = \frac{\varphi_\nu - \sum_{i=1}^{\nu-1} (\varphi_\nu, \overline{\varphi_i})\, \overline{\varphi_i}}{\left\| \varphi_\nu - \sum_{i=1}^{\nu-1} (\varphi_\nu, \overline{\varphi_i}) \overline{\varphi_i} \right\|} \quad \text{mit} \quad \nu \neq \mu , \qquad [4.54]$$

$$\Psi_\mu = \varphi_\mu - \sum_{\nu=1}^{N} (\varphi_\mu, \overline{\varphi_\nu})\, \overline{\varphi_\nu} \quad \text{mit} \quad \nu \neq \mu . \qquad [4.62]$$

Bei der Bildung der inneren Produkte geht jeweils die Belegfunktion $\alpha(\lambda) = \frac{1}{F^2(\lambda)}$ ein, so daß die errechneten Funktionen Ψ_μ von der angenommenen Meßgenauigkeit abhängen.

Im Gegensatz zu der Orthogonalitätsmethode hat man, statt ein lineares Gleichungssystem N-ter Ordnung zu lösen, N Funktionen Ψ_μ nach dem Orthonormierungsverfahren nach E.Schmidt zu berechnen. Um Mißverständnissen vorzubeugen, sei betont, daß nicht alle Ψ_μ durch ein einziges Orthonormierungsverfahren mit N Schritten zu erhalten sind. Will man das Element Ψ_μ berechnen, so muß stets die entsprechende Grundkomponente φ_μ bis zum Schluß gelassen werden; denn man muß von φ_μ die Projektion in den von allen φ_ν mit $\nu \neq \mu$ aufgespannten Teilraum abziehen. So kommt man nicht umhin, für die verschiedenen Komponenten das Orthonormierungsverfahren jeweils teilweise zu wiederholen.

.41. Anwendungen der beschriebenen Theorie

Als Beispiel für die beschriebene Theorie betrachten wir Nucleotidgemische; denn die verschiedenen Nucleotide haben, wie die Nucleoside (siehe 1.Kapitel), im ultravioletten Licht unterschiedliche Absorptionsspektren.

Auf dem unteren Teil der Abbildung 4.1 sind die Spektren des Adenosin-3'-Phosphates (AMP), des Cytidin-3'-Phosphates (CMP), des Guanosin-3'-Phosphates (GMP) und des Uridin-3'-Phosphates (UMP) wiedergegeben. Die Spek-

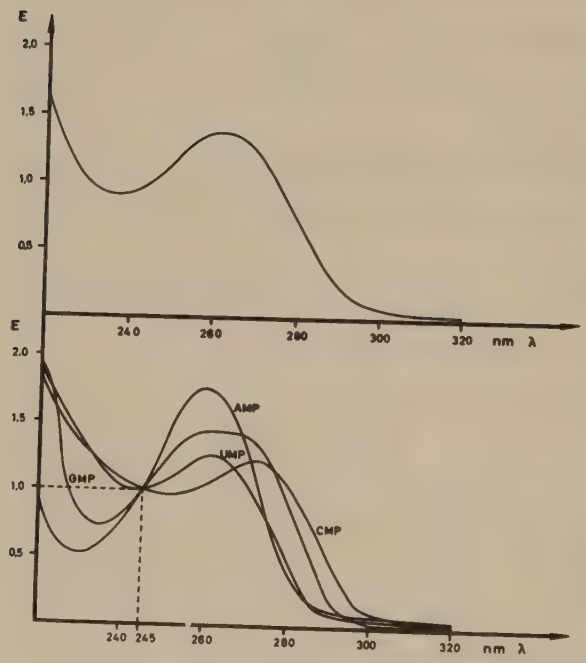


Abb. 4.1.

Untere Hälfte: Spektren der vier Nucleotide AMP: Adenosin-3'-Phosphat, CMP: Cytidin-3'-Phosphat, GMP: Guanosin-3'-Phosphat, UMP: Uridin-3'-Phosphat bei einer Wasserstoffionenkonzentration von pH=13. Obere Hälfte: Ein Summenspektrum aus den vier Nucleotiden.

Nimmt man an, daß die absolute Genauigkeit der photometrischen Messung für den gesamten Meßbereich konstant ist und daß dieser Meßfehler 2% der gemessenen Extinktion bei 245nm beträgt, so ergaben sich die Anteile wie folgt. (Es wurden 227 Meßwerte verwendet.) AMP: (28,1±0,6)%, GMP: (23,2±1,1)%, CMP: (32,9±0,8)%, UMP: (15,8±0,7)%.

tren wurden bei einer Wasserstoffionenkonzentration von pH = 13 aufgenommen.

Als Einheiten der Konzentrationen x_μ (μ = 1 bis 4) wurden diejenigen Substanzmengen je Volumeneinheit gewählt, die in einer 0,5cm dicken Küvette das Licht einer Wellenlänge von 245nm bis auf 1/10 absorbieren. Diese spezielle Normierung der Konzentrationseinheiten wurde durchgeführt, um für die Fehlerbetrachtungen übersichtlichere Verhältnisse zu schaffen.

Auf dem oberen Teil der Abbildung 4.1 ist ein Summenspektrum aus 28,1% AMP, 32,9% CMP, 23,2% GMP und 15,8% UMP wiedergegeben.

Nach der beschriebenen Theorie haben wir die Funktionen

$$g_\mu(\lambda) = \left(\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \alpha(\lambda) d\lambda \right)^{-1} h_\mu(\lambda) \alpha(\lambda) \qquad [4.90]$$

für μ = 1, 2, 3, 4 berechnet. Es wird angenommen, daß in dem gemessenen Spektralbereich die Meßgenauigkeit überall konstant ist.

Die gefundenen Kurvenverläufe sind auf der Abbildung 4.2 wiedergegeben. Die Kurven sind durch die entsprechenden abgekürzten Stoffbezeichnungen, wie AMP, CMP, GMP und UMP, kenntlich gemacht. Die Berechnung der Funktionen $g_\mu(\lambda)$ (μ = 1 bis 4) erfolgte mit der TR4 der Marburger Rechenanlage, und zwar erfolgte die Berechnung mit dem Programm 68-1-D23 (siehe Anhang).

Kennt man die Funktionen $g_\mu(\lambda)$ mit μ = 1 bis 4, so erhält man die gesuchten Konzentrationen als

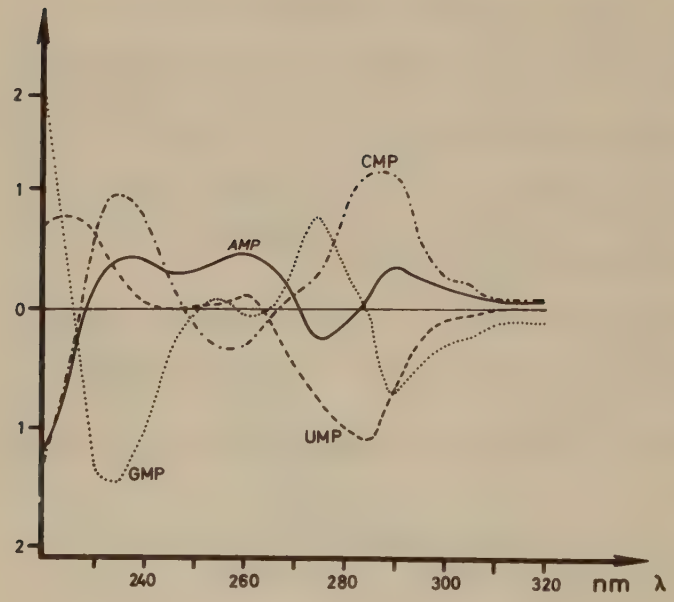


Abb.4.2.

Die Funktionen $g_\mu(\lambda)$ für AMP, CMP, GMP und UMP als Funktionen der Wellenlänge λ. Mit Hilfe dieser Funktionen $g_\mu(\lambda)$ erhält man aus einem Summenspektrum $y(\lambda)$ die entsprechenden Konzentrationen x_μ der Nucleotide als

$$x_\mu = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} y(\lambda)\, g_\mu(\lambda)\, d\lambda, \quad \nu = 1 \text{ bis } 4.$$

$$x_\mu = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} y(\lambda)\, g_\mu(\lambda)\, d\lambda \qquad [4.91]$$

mit $\mu = 1$ bis 4.

4.42. Beispiele für die zu erwartenden Fehler bei verschiedenen Auswertverfahren

Wir kommen jetzt noch einmal auf die Fehler zurück. Um die Fehler verschiedener Verfahren besser miteinander vergleichen zu können, nehmen wir einige Umformungen vor. Für den Fehler des betrachteten Verfahrens ergab sich

$$\left|\Delta x_\mu\right|_{\text{Min}} = \frac{1}{M_\alpha \left\|\psi_\mu\right\|} \cdot \qquad [4.83]$$

Kennen wir nicht die Funktion ψ_μ, sondern nur den Quotienten

$$h_\mu = \frac{\psi_\mu}{\left\|\psi_\mu\right\|^2}, \qquad [4.87]$$

so ergibt sich der Fehler durch den Ausdruck

$$\left|\Delta x_\mu\right|_{\text{Min}} = \frac{1}{M_\alpha} \left(\frac{\psi_\mu}{\left\|\psi_\mu\right\|^2} , \frac{\psi_\mu}{\left\|\psi_\mu\right\|^2} \right)^{1/2} . \qquad (4.92)$$

Als nächstes wird ein Auswertverfahren

$$x_\mu = \frac{(y, f_M)}{(\varphi_\mu, f_M)} \qquad [4.61]$$

betrachtet, welches nicht "optimal" ist.

Mit

$$\hat{g}_\mu = \frac{f_M}{(\varphi_\mu, f_M)} \tag{4.94}$$

erhalten wir

$$x_\mu = (y, \hat{g}_\mu) . \tag{4.95}$$

Nach (4.64) können wir f_M in zwei zueinander orthogonale Anteile zerlegen. Es ergibt sich

$$\hat{g}_\mu = \frac{\varrho \psi_\mu + \varkappa f_0}{(\varphi_\mu, f_M)} . \tag{4.96}$$

Benutzen wir die Beziehung

$$(\varphi_\mu, f_M) = \varrho \| \psi \|^2, \tag{4.70}$$

so erhalten wir

$$\frac{\varkappa}{\varrho} \frac{f_0}{\| \psi_\mu \|^2} = \hat{g}_\mu - \frac{\psi_\mu}{\| \psi_\mu \|^2} . \tag{4.97}$$

Wir setzen diesen Ausdruck in die Beziehung (4.81) für den Fehler Δx_μ ein und bekommen damit

$$|\Delta x_\mu| = \frac{1}{M_\alpha \| \psi_\mu \|} \left(1 + \| \alpha_\mu \| \left\| \hat{g}_\mu - \frac{\psi_\mu}{\| \psi_\mu \|^2} \right\|^2 \right)^{1/2} . \tag{4.98}$$

Vergleichen wir diesen Fehler mit dem kleinsten, möglichen Fehler

$$|\Delta x_\mu|_{Min} = \frac{1}{M_\alpha \| \psi_\mu \|} , \tag{4.79}$$

so erhalten wir als Quotienten

$$\frac{|\Delta x_\mu|}{|\Delta x_\mu|_{Min}} = \left(1+\left\|\hat{g}_\mu - \frac{\psi_\mu}{\|\psi_\mu\|^2}\right\|^2\right)^{1/2} \qquad (4.99)$$

Aus dieser Formel erkennt man, in welcher Weise der zu erwartende Fehler ansteigt, wenn man ein Auswertverfahren

$$x_\mu = (y, \hat{g}_\mu) \qquad [4.95]$$

benutzt, bei dem

$$\hat{g}_\mu \neq \frac{\psi_\mu}{\|\psi_\mu\|^2} \qquad (4.100)$$

gilt.

Beispiel

Mischungen von reduziertem und oxygeniertem Hämoglobin bilden ein Zweikomponentensystem. Für dieses System wollen wir zwei verschiedene Auswertverfahren miteinander vergleichen. Die Spektren des Hämoglobins sind auf der Abbildung 1.1 wiedergegeben.

Wir führen als erstes die Auswertung mit Hilfe von zwei möglichst günstigen Extinktionswerten durch. Es werden die Werte bei λ_1 = 542nm und λ_2 = 558nm benutzt. Wie man auf der Abbildung 1.1 sieht, sind es die Werte, für die die Grundkomponenten Maxima beziehungsweise Minima haben.

Wir vergleichen diese 2 Punkte-Auswertung mit dem Verfahren, welches den kleinsten Fehler garantiert und bei

dem alle 227 vom Rapidspektrophotometer im Bereich von etwa 500-600nm gemessenen Extinktionswerte berücksichtigt werden. Wir nehmen an, daß wir für den gesamten Wellenlängenbereich einen gleichen Meßfehler zu erwarten haben.

Die Berechnungen nach der Formel (4.99) ergaben, daß wir mit der zuletzt genannten Methode einen Fehler zu erwarten haben, der weniger als

20 %

des Fehlers der 2 Punkte-Methode beträgt. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm 68-1-D23 des Anhanges.

4.43. Die Fehler bei der Analyse von Nucleotid- und Nucleosidspektren

Die folgenden Ausführungen sind speziell auf die Auswertung von Nucleotidspektren und Nucleosidspektren zugeschnitten. Sie gelten entsprechend auch für andere Systeme.

Wir betrachten den Fehler

$$\left| \Delta x_\mu \right|_{\text{Min}} = \frac{1}{M_\alpha \left\| \psi_\mu \right\|} , \qquad [4.83]$$

dabei ist

$$M_\alpha = \left(\sum_{i=1}^{M} \alpha_i \right)^{1/2} . \qquad [4.76]$$

Wir nehmen an, wir haben im gesamten gemessenen Spek-

tralbereich eine gleich gute Meßgenauigkeit. Das heißt

$$F_i = F_o \text{ für } i = 1 \text{ bis } M \tag{4.101}$$

oder

$$\alpha_i = \frac{1}{F_o^2} \text{ für } i = 1 \text{ bis } M \,. \tag{4.102}$$

Damit ergibt sich aus (4.76) die Beziehung

$$M_\alpha = \frac{\sqrt{M}}{F_o} \tag{4.103}$$

oder

$$\left| \Delta x_\mu \right|_{Min} = \frac{F_o}{\sqrt{M} \, \| \psi_\mu \|} \,. \tag{4.104}$$

Wir dividieren beide Seiten dieser Gleichung durch den Extinktionswert

$$y_o = y(\lambda_o) \text{ mit } \lambda_o = 245\text{nm} \tag{4.105}$$

und erhalten

$$\frac{\left| \Delta x_\mu \right|_{Min}}{y_o} = \frac{F_o / y_o}{\sqrt{M} \, \| \psi_\mu \|} \,. \tag{4.106}$$

Nach (4.4) gilt

$$y_o = \sum_{\nu=1}^{4} x_\nu \varphi_\nu(\lambda_o) \,. \tag{4.107}$$

Wie oben bereits beschrieben, haben wir die Grundspektren durch Festlegung der Konzentrationseinheiten so normiert, daß für eine Wellenlänge von $\lambda_o = 245\text{nm}$ die Beziehung

$$\varphi_1(\lambda_o) = \varphi_2(\lambda_o) = \varphi_3(\lambda_o) = \varphi_4(\lambda_o) \qquad (4.108)$$

gilt. Wir schreiben für diese gleichen Größen die Abkürzung

$$\varphi_o \,. \qquad (4.109)$$

Damit erhalten wir aus (4.107) die Beziehung

$$y_o = \varphi_o \sum_{\nu=1}^{4} x_\nu \,. \qquad (4.110)$$

Hiermit folgt wiederum aus (4.106) die Gleichung

$$\frac{|\Delta x_\mu|_{Min}}{\sum_{\nu=1}^{4} x_\nu} = \frac{F_o/y_o}{\sqrt{M}\,\|\psi_\mu\|/\varphi_o} \,. \qquad (4.111)$$

Auf der linken Seite der Gleichung steht der Fehler der μ-ten Komponente

$$|\Delta x_\mu|_{rel} = \frac{|\Delta x_\mu|_{Min}}{\sum_{\nu=1}^{4} x_\nu} \qquad (4.112)$$

als Bruchteil der Gesamtkonzentration. Auf der rechten Seite der Gleichung (4.111) steht im Zähler der Meßfehler der Extinktionskurve

$$\varepsilon = \frac{F_o}{y_o} \qquad (4.113)$$

bezogen auf den Meßwert bei einer Wellenlänge von 245nm. Im Nenner steht neben der Wurzel aus der Zahl der Meßwerte die Norm der Funktion ψ_μ als ein Vielfaches des Extinktionswertes φ_o. Mit den soeben eingeführten Abkürzungen erhalten wir für den relativen Fehler der μ.

Konzentration

$$|\Delta x_\mu|_{rel} = \frac{\varepsilon}{\sqrt{M}} \cdot \frac{\varphi_0}{\|\psi_\mu\|} \quad . \tag{4.114}$$

Beim Rapidspektrophotometer messen wir 227 Extinktionswerte. Daraus folgt

$$\sqrt{M} = \sqrt{227} = 15{,}1 \quad . \tag{4.115}$$

Für den relativen Fehler bei der Analyse von Nucleotidspektren, wie sie auf der Abbildung 4.1 zu sehen sind, erhalten wir

$$\begin{aligned} &\text{AMP: } |\Delta x_1|_{rel} = 0{,}3 \cdot \varepsilon \,, \\ &\text{CMP: } |\Delta x_2|_{rel} = 0{,}4 \cdot \varepsilon \,, \\ &\text{GMP: } |\Delta x_3|_{rel} = 0{,}55 \cdot \varepsilon \,, \\ &\text{UMP: } |\Delta x_4|_{rel} = 0{,}35 \cdot \varepsilon \,. \end{aligned} \tag{4.116}$$

Nehmen wir an, die Meßungenauigkeit ε des Photometers sei 2% von dem Meßwert bei der Wellenlänge $\lambda_0 = 245\text{nm}$, so ergibt die Analyse des Summenspektrums auf der Abbildung 4.1 die folgenden Werte

$$\begin{aligned} &\text{AMP: } (28{,}1 \pm 0{,}6)\%, \\ &\text{CMP: } (32{,}9 \pm 0{,}8)\%, \\ &\text{GMP: } (23{,}2 \pm 1{,}1)\%, \\ &\text{UMP: } (15{,}8 \pm 0{,}7)\%. \end{aligned} \tag{4.117}$$

Entsprechende Untersuchungen führten wir mit den Nucleosidspektren durch, wie sie auf der Abbildung 1.6

zu sehen sind. Hier normierten wir die Grundkomponenten bei einer Wellenlänge λ_o = 265nm, so daß

$$\varphi_1(\lambda_o) = \varphi_2(\lambda_o) = \varphi_3(\lambda_o) = \varphi_4(\lambda_o) = \varphi_o \qquad (4.118)$$

gilt. Wir nehmen an, in dem gesamten betrachteten Spektralbereich von 220-320nm haben wir gleiche Meßungenauigkeiten zu erwarten. Wir fanden für

$$\text{Adenosin: } \frac{\|\psi_1\|}{\varphi_o} = 4{,}6\%,$$

$$\text{Cytidin: } \frac{\|\psi_2\|}{\varphi_o} = 24{,}7\%,$$

$$\text{Guanosin: } \frac{\|\psi_3\|}{\varphi_o} = 14{,}1\%,$$

$$\text{Uridin: } \frac{\|\psi_4\|}{\varphi_o} = 6{,}1\%. \qquad (4.119)$$

Hieraus erhalten wir für die relativen Fehler bei 227 Meßwerten die Werte

$$\text{Adenosin: } |\Delta x_1|_{rel} = 1{,}4 \cdot \varepsilon ,$$

$$\text{Cytidin: } |\Delta x_2|_{rel} = 0{,}3 \cdot \varepsilon ,$$

$$\text{Guanosin: } |\Delta x_3|_{rel} = 0{,}5 \cdot \varepsilon ,$$

$$\text{Uridin: } |\Delta x_4|_{rel} = 1{,}1 \cdot \varepsilon . \qquad (4.120)$$

4.44. Die Berechnung der Größen h_μ und der Skalarprodukte (y, h_μ)

Im Anhang sind die Programme wiedergegeben, mit denen man die Berechnung der Größen $\hat{g}_\mu$ und h_μ der Auswertformeln

$$x_\mu = (y, \hat{g}_\mu) \qquad [4.44]$$

beziehungsweise

$$x_\mu = (y, h_\mu) \qquad [4.84]$$

vornehmen kann. Es handelt sich um die Programme

67-10-D5 (PDP8), 67-11-FD14 (TR4),
67-12-D18 (PDP8), 67-7-D20 (PDP8),
68-1-D22 (PDP8), 68-1-D23 (TR4).

Vor den Programmen ist jeweils eine ausführliche Beschreibung der Programme wiedergegeben, aus der man ersehen kann, für welche speziellen Gegebenheiten das jeweilige Programm geschrieben wurde. Mit Hilfe der Programme

67-10-D10 (PDP8), 67-10-D11 (PDP8) und 67-10-D12 (PDP8)

können dann die Skalarprodukte $x_\mu = (y, h_\mu)$ berechnet werden. Die Probleme bei der Berechnung der Skalarprodukte liegen in der beschränkten Zeit, die zur Verfügung steht. Auf die damit zusammenhängenden Fragen wird im 6.Kapitel genauer eingegangen.

Um den mathematischen Verfahrensfehler zu ermitteln, haben wir uns mit Hilfe des Programmes 67-10-D4 (PDP8) Summenspektren errechnet. Diese Spektren haben wir anschließend mit den angegebenen Programmen wieder analysiert. Wir haben so den mathematischen Verfahrensfehler $|\Delta f|$ in prozentualen Anteilen der Gesamtkonzentration, wie sie bei der Analyse von Nucleotid- und Nucleosidgemischen auftreten, ermittelt.

Bei der Analyse der Summenspektren mit dem in 4.2 beschriebenen Verfahren (Ausgleichsrechnung nach der Metho-

de der kleinsten Quadrate von Gauß) erhielten wir Verfahrensfehler

$$|\Delta f| \leq 0{,}4\,\%\,. \qquad (4.121)$$

Die Analysen erfolgten ausschließlich auf dem Rechner PDP8. Die Lösung der auftretenden linearen Gleichungssysteme wurde mit dem Gaußschen Algorithmus durchgeführt.

Analysieren wir die Spektren mit dem zuletzt beschriebenen Verfahren mit dem kleinsten zu erwartenden Fehler, so erhalten wir Werte

$$|\Delta f| \leq 5\cdot 10^{-5}\,. \qquad (4.122)$$

Die Berechnung der Funktionen $h_\mu(\lambda)$ erfolgte mit der TR4 des Marburger Rechenzentrums, und die Bildung der Skalarprodukte

$$x_\mu = (y, h_\mu) \qquad [4.88]$$

erfolgte mit dem Rechner PDP8.

Wir glauben, daß die Unterschiede in den Verfahrensfehlern im wesentlichen darauf zurückzuführen sind, daß es bei dem letztgenannten Verfahren umgangen wird, lineare Gleichungssysteme zu lösen.

4.45. Extinktionsabhängige Meßfehler

In den bisherigen Ausführungen wurde stets angenommen, daß man den zu erwartenden Meßfehler $|F(\lambda)|$ vor der Messung als Funktion der Wellenlänge abschätzen kann. Mit diesem Fehler wurde die Belegfunktion

$$\alpha(\lambda) = \frac{1}{F^2(\lambda)} \qquad [4.32]$$

für die Skalarprodukte konstruiert.

In vielen Fällen weiß man, daß der Meßfehler in mehr oder minder großem Maße von der Größe der gemessenen Extinktionswerte abhängt.

Ehe wir auf die Möglichkeiten zur Berücksichtigung derartiger Fehler eingehen, werden wir die Extinktionsabhängigkeit der durch das Rauschen bedingten Fehler nachweisen.

Das Rauschen des Sekundärelektronenvervielfachers, der im Rapidspektrophotometer benutzt wird, ist vor allem für ultraviolettes Licht eine beachtliche Fehlerquelle. Es soll jetzt berechnet werden, in welchem Zusammenhang die durch das Rauschen zu erwartenden Schwankungen der Extinktionswerte F mit der Größe der Extinktionswerte y stehen. Wir beziehen uns auf die Verhältnisse, wie sie beim Rapidspektrophotometer vorliegen.

Zum Strom der Meßsignale I_M kommt der Rauschanteil ΔI_M dazu. Wir messen

$$I_M \pm \Delta I_M \,. \qquad (4.123)$$

Entsprechendes gilt für den Vergleichskanal, dort messen wir

$$I_V \pm \Delta I_V \,. \qquad (4.124)$$

Für den Extinktionswert y erhalten wir nach (2.25) den Ausdruck

$$y \pm F = \log \frac{I_V \pm \Delta I_V}{I_M \pm \Delta I_M} \qquad (4.125)$$

oder

$$y \pm F = \log \frac{I_V}{I_M} + \log \left(1 \pm \frac{\Delta I_V}{I_V}\right) - \log \left(1 \pm \frac{\Delta I_M}{I_M}\right) . \qquad (4.126)$$

Wir setzen näherungsweise

$$\log \left(1 \pm \frac{\Delta I_V}{I_V}\right) \approx \left(\pm \frac{\Delta I_V}{I_V} \right) \qquad (4.127)$$

und

$$\log \left(1 \pm \frac{\Delta I_M}{I_M}\right) \approx \pm \frac{\Delta I_M}{I_M} , \qquad (4.128)$$

da wir annehmen können, daß die Rauschanteile ΔI_V und ΔI_M der Photoströme klein gegen die Photoströme selbst sind. Wir erhalten unter Verwendung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes aus (4.126) - (4.128) die Beziehung

$$|F| = \left(\frac{\Delta I_V^2}{I_V^2} + \frac{\Delta I_M^2}{I_M^2} \right)^{1/2} . \qquad (4.129)$$

Der Photostrom entsteht durch die Summation von Teilströmen, die statistischen Schwankungen unterworfen sind. Deshalb kann man annehmen, daß das Quadrat der Schwankungen des Photostromes proportional dem Photostrom selbst ist.[25,45] Daher gilt

$$\Delta I_M^2 = a I_M \qquad (4.130)$$

und

$$\Delta I_V^2 = a\, I_V . \qquad (4.131)$$

Mit diesen Beziehungen erhält man aus (4.129) den Ausdruck

$$|F| = \left[\frac{a}{I_V} + \frac{a}{I_M}\right]^{1/2} \qquad (4.132)$$

oder

$$|F| = \left[\frac{a}{I_V}\,(1 + 10^{-y})\right]^{1/2} . \qquad (4.133)$$

Man bedenke dabei, daß für den Extinktionswert y die folgende Beziehung

$$y = \log \frac{I_V}{I_M} \qquad [2.25]$$

gilt. Der Rauschanteil der Signale hängt außer von der Materialkonstanten a von dem Extinktionswert y und von dem Photostrom I_V im Vergleichskanal ab.

Hängen die zu erwartenden Fehler, wie hier, von dem Extinktionswert y ab, so können die Funktionen $h_\mu(\lambda)$ des "optimalen" Auswertverfahrens

$$x_\mu = (y, h_\mu) \qquad [4.88]$$

streng genommen erst nach Messung der Spektren $y(\lambda)$ berechnet werden. Bei sich schwach ändernden Signalen wird man nicht für jedes Spektrum die Funktionen $h_\mu(\lambda)$ neu berechnen. Man wird die gleichen Funktionen $h_\mu(\lambda)$ für eine Gruppe von Spektren benutzen können. Inwieweit die Werte $h_\mu(\lambda)$ noch als gut anzusehen sind, läßt sich durch die oben gegebenen Fehlerabschätzungen (4.99) entscheiden.

5.Kapitel

Die Unterdrückung von Gleichspannungsanteilen bei den Spektren des Rapidspektrophotometers

Häufig ist es sinnvoll, die photometrischen Meßwerte nicht als reine Extinktionswerte $E(\lambda)$, sondern mit einer additiven Konstanten K versehen, zu übernehmen. Wir erfassen

$$m(\lambda) = E(\lambda) + K \,. \qquad (5.1)$$

Wie aus den folgenden Ausführungen hervorgeht, ist die Konstante K bei unserer Versuchsanordnung negativ.

Die Lichtverluste durch Streuung und Kompensationsprobleme lassen die Abspaltung einer additiven Konstanten wünschenswert erscheinen.

Neben der Absorption führt die Streuung zu einer Schwächung der eingestrahlten Strahlung. Bei der Rayleighschen Streuung erwarten wir für den von der Streuung herrührenden Anteil des Extinktionskoeffizienten eine Abhängigkeit proportional $1/\lambda^4$.[6,83] Bei diffuser Streuung, bei der die streuenden Teilchen groß gegen die benutzte Wellenlänge sind, erwarten wir, daß die Streuung weitgehend wellenlängenunabhängig ist. Bei unseren biologischen Objekten sind beide Formen der angedeuteten Extremfälle sowie Übergänge und Mischformen denkbar.

Es hat sich empirisch gezeigt, daß bei den Spektren

für den Extinktionsanteil der Streuung der Ansatz

$$E_{Streu.} = a_1 \lambda + a_o \qquad (5.2)$$

eine in vielen Fällen ausreichende Näherung ist.[96,99,125.] a_1 und a_o sind die jeweils empirisch zu bestimmenden Konstanten. Man bedenke dabei, daß wir in den meisten Fällen nur in einem Wellenlängenbereich mit der Bandbreite von 100-200nm messen. Abgesehen von der Umgebung des singulären Punktes $\lambda = 0$ läßt sich die Funktion $1/\lambda^4$ durch Geraden annähern. Aus den Sätzen der Funktionentheorie[103,31] weiß man, daß die meromorphe Funktion $1/z^4$ um jeden Punkt z_o mit $z_o \neq 0$ in eine Potenzreihe mit einem Konvergenzkreis durch den Nullpunkt $z = 0$ entwickelbar ist.

Es gilt

$$f(z) = \sum_{\nu=1}^{\infty} a_\nu (z-z_o)^\nu, \quad a_\nu = \frac{1}{\nu!} \frac{d^\nu}{dz^\nu} f(z_o) . \qquad (5.3)$$

Bricht man diese Entwicklung nach dem zweiten Gliede ab, so ist damit eine Annäherung durch eine Gerade gegeben.

Bei den Objekten, bei denen man mit Lichtverlusten durch Streuung zu rechnen hat, scheint es uns daher sinnvoll, die Meßsignale gleich nur bis auf eine additive Konstante zu erfassen. Wegen der Streuung ist die Messung des Absolutpegels häufig sinnlos.

Vielfach haben wir eine hohe Extinktion für alle Wellenlängen, während die Modulation des Signales nur relativ gering ist. Um diese Modulation möglichst genau

zu erfassen, wäre es sinnvoll, eine Kompensation mit einer für alle Wellenlängen konstanten Extinktion vorzunehmen.

Die Kompensation läßt sich

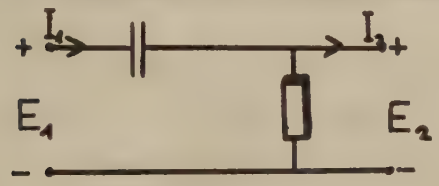
1. auf optischem Wege erreichen. Wir schwächen den Vergleichsstrahl mit Graufilter der Firma Schott oder mit Graphit beschichtetem Papier.
2. auf elektrischem Wege vornehmen. Vor der Logarithmierstufe werden im Rapidspektrophotometer die Signale des Meß- und Vergleichskanals vorübergehend getrennt. Die getrennten Signale können durch Potentiometer geteilt werden. In unserem Photometer haben wir nachträglich diese Signalabschwächung eingebaut, während die neuen Modelle des Rapidspektrophotometers, auf unsere Anregung hin, diese Möglichkeit bereits standardmäßig enthalten.
3. durch die Übernahme der elektrischen Meßsignale mit einem richtig dimensionierten RC-Glied erreichen. Damit unterdrücken wir den Gleichstromanteil. Wir haben dabei allerdings keinen Anhalt über das Maß der Kompensation.

5.1. Die Wirkung eines RC-Gliedes auf die Meßsignale

Da diese meßtechnischen Probleme sehr wesentlich für die Aufnahme der Spektren sind, beschreiben wir sie ausführlich. Um den Zusammenhang zu wahren, halten wir es für erforderlich, einige in der Wechselstromlehre

bekannte Zusammenhänge zu erwähnen. Wir bauen dann auf diese Beziehungen auf und ziehen aus ihnen für unsere Meßprobleme wichtige Folgerungen.

Wir betrachten die folgende Schaltung



Nach der Vierpolrechnung erhält man für die Kettenmatrix[135]

$$\begin{pmatrix} E_1 \\ I_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & \frac{1}{pC} \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ \frac{1}{R} & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_2 \\ I_2 \end{pmatrix}, \tag{5.4}$$

$p = \frac{d}{dt}$ hat die Bedeutung des zeitlichen Differentialoperators. Aus der obigen Matrizengleichung ergibt sich

$$\begin{pmatrix} E_1 \\ I_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 + \frac{1}{pCR} & \frac{1}{pC} \\ \frac{1}{R} & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_2 \\ I_2 \end{pmatrix}, \tag{5.5}$$

$$E_1 = E_2 + \frac{E_2}{pCR} + \frac{I_2}{pC}, \tag{5.6}$$

$$I_1 = \frac{E_2}{R} + I_2 . \tag{5.7}$$

Für den Fall des Leerlaufes ist $I_2 = 0$ und

$$CRpE_2 + E_2 = CRpE_1 . \tag{5.8}$$

Die Multiplikation mit dem Operator p bedeutet die zeitliche Differentiation. Wir erhalten

$$\frac{d}{dt} E_2(t) + \frac{1}{CR} E_2(t) = \frac{d}{dt} E_1(t) \quad . \tag{5.9}$$

Dies ist eine inhomogene lineare Differentialgleichung 1.Ordnung mit konstanten Koeffizienten. Die Lösung für die Anfangsbedingung $E_2(t=-\infty) = 0$ gibt die Heaviside-Formel[134].

$$E_2(t) = e^{-\frac{t}{RC}} \int_{-\infty}^{t} e^{\frac{t'}{RC}} \frac{d}{dt'} E_1(t')dt' \tag{5.10}$$

Die Lösung für $t = \xi$ und $E_2(\xi) = \eta$ lautet[103]

$$E_2(t) = e^{-\frac{t-\xi}{RC}} \left(\eta + \int_{\xi}^{t} e^{\frac{t'-\xi}{RC}} \frac{d}{dt'} E_1(t')dt'\right) . \tag{5.11}$$

$E_1(t)$ ist die Spannung am Eigang und $E_2(t)$ die Spannung am Ausgang des RC-Gliedes. $E_1(t)$ wird eine mit 50Hz periodische Funktion sein, die auch die anderen "Dirichletschen Bedingungen" erfüllt, so daß wir sie in eine Fourierreihe

$$E_1(t) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} c_n e^{i\omega_n t} \tag{5.12}$$

entwickeln können.[134,103] Dabei ist

$$\omega_n = \frac{2\pi}{T} n \quad . \tag{5.13}$$

Setzen wir weiter voraus, daß $E_1(t)$ überall stetig differenzierbar ist, so konvergiert die Reihe sowie die gliedweise abgeleitete Reihe absolut und gleichmäßig.[103] Die gliedweise abgeleitete Reihe

$$\frac{d}{dt} E_1(t') = \sum_{n=1}^{\infty} (i\omega_n c_n e^{i\omega_n t}) + \sum_{n=-1}^{-\infty} (i\omega_n c_n e^{i\omega_n t}) \tag{5.14}$$

stellt die Ableitung der ursprünglichen Funktion dar. Wir setzen in (5.11) ein und erhalten

$$E_2(t) = e^{-\frac{t-\xi}{RC}}\left(\eta + \int_{\xi}^{t}\left(\sum_{n=1}^{\infty} i\omega_n c_n e^{i\omega_n t'} + \sum_{n=-1}^{-\infty} i\omega_n c_n e^{i\omega_n t'}\right)e^{\frac{t'-\xi}{RC}}\,dt'\right). \tag{5.15}$$

Die Reihendarstellung der Funktion $\frac{d}{dt'}E_1(t')$ wird mit dem Faktor $e^{t-\xi/RC}$ multipliziert. Da dieser unabhängig von n ist, wird die Konvergenz der Reihe nicht beeinträchtigt. Damit können wir die so entstandene Reihe auch wieder gliedweise integrieren. Wir erhalten

$$E_2(t) = e^{-\frac{t}{RC}}\left(\eta e^{\xi/RC} + \int_{\xi}^{t}\left(\sum_{n=1}^{\infty} i\omega_n c_n e^{t(i\omega_n+\frac{1}{RC})} + \sum_{n=-1}^{-\infty} i\omega_n c_n e^{t(i\omega_n+\frac{1}{RC})}\right)\right), \tag{5.16a}$$

$$E_2(t) = e^{-\frac{t-\xi}{RC}}\left(\eta - \sum_{n=1}^{\infty}\frac{i\omega_n}{i\omega_n+1/RC}c_n e^{\xi i\omega_n} - \sum_{n=-1}^{-\infty}\frac{i\omega_n}{i\omega_n+1/RC}c_n e^{\xi i\omega_n}\right)$$

$$+\sum_{n=1}^{\infty}\frac{i\omega_n}{i\omega_n+1/RC}c_n e^{i\omega_n t} + \sum_{n=-1}^{-\infty}\frac{i\omega_n}{i\omega_n+1/RC}c_n e^{i\omega_n t}. \tag{5.16b}$$

Für $t-\xi \gg RC$ brauchen wir den mit dem Faktor $e^{-(t-\xi)/RC}$ versehenen Anteil nicht mehr zu berücksichtigen, so daß wir dann schreiben können

$$E_2(t) = \sum_{n=1}^{\infty}\frac{i\omega_n}{i\omega_n+1/RC}c_n e^{i\omega_n t} + \sum_{n=-1}^{-\infty}\frac{i\omega_n}{i\omega_n+1/RC}c_n e^{i\omega_n t}. \tag{5.17}$$

Vergleicht man diese Ausgangsspannung am RC-Glied mit der Spannung am Eingang

$$E_1(t) = \sum_{n=0}^{\infty} c_n e^{i\omega_n t} + \sum_{n=-1}^{-\infty} c_n e^{i\omega_n t}, \qquad [5.12]$$

so erkennt man, daß $E_2(t)$ den Summanden c_o nicht mehr enthält und daß alle anderen Fourierkomponenten mit dem zusätzlichen Faktor

$$\frac{i\omega_n}{i\omega_n + \frac{1}{RC}} = \frac{1}{1 - \frac{i}{RC\omega_n}} \qquad (5.18)$$

versehen sind.

Ist für alle wesentlich am Spektrum beteiligten ω_n die Bedingung $RC \ll \frac{1}{\omega_n}$ erfüllt, so gilt

$$\frac{i\omega_n}{i\omega_n + \frac{1}{RC}} = \frac{i\omega_n RC}{1 + i\omega_n RC} \approx i\omega_n RC \qquad (5.19)$$

Setzen wir dies in den Ausdruck (5.17) ein, so erhalten wir

$$E_2(t) \approx RC \sum_{n=1}^{\infty} i\omega_n c_n e^{i\omega_n t} + RC \sum_{n=-1}^{-\infty} i\omega_n c_n e^{i\omega_n t}, \qquad (5.20)$$

$$E_2(t) \approx RC \frac{d}{dt} E_1(t) . \qquad (5.21)$$

Wir finden das in der Elektrotechnik bekannte Ergebnis, daß man mit einem entsprechend dimensionierten RC-Glied differenzieren kann.

Ist $RC \gg \frac{1}{\omega_n}$ für alle ω_n, so ist der Fortfall der konstanten Fourierkomponenten der Haupteffekt des RC-Gliedes.

Wir untersuchen den für uns wichtigen Fall noch etwas

genauer, indem wir uns die Differenz der Eingangs- und Ausgangsspannung errechnen. Wir erhalten

$$E_1(t)-E_2(t) = c_o + 2\sum_{n=1}^{\infty} \varepsilon_n c_n \sin\omega_n t \ , \qquad (5.22)$$

dabei ist

$$\varepsilon_n = \left(i - \frac{i}{1 + \frac{i}{RC\omega_n}} \right) \qquad (5.23)$$

Für $RC \gg \frac{1}{\omega_n}$ gilt

$$\varepsilon_n \approx \frac{1}{RC\omega_n} \ . \qquad (5.24)$$

Damit ergibt sich

$$E_1(t) - E_2(t) = c_o + 2\sum_{n=1}^{\infty} \frac{c_n}{RC\omega_n} \sin\omega_n t \ . (5.25)$$

Für $RC \gg \frac{1}{\omega_n}$ kann man die ganze rechte Summe Null setzen, so daß

$$E_1(t) - E_2(t) \approx c_o \qquad (5.26)$$

wird. Damit wissen wir, daß durch die RC-Kopplung die Signalspannung so verschoben wird, daß das zeitliche Integral über die Signalspannung Null wird.

Ist es aus technischen Gründen nicht möglich, die Bedingung $RC \gg \frac{1}{\omega_n}$ in genügendem Maße einzuhalten, so läßt sich der gemachte Fehler durch entsprechende Rechnungen weitgehend wieder beseitigen. Man errechnet aus den in den Rechner übernommenen Meßwerten die Fourierkoeffizienten. Man kann dann mit den oben angegebenen Formeln die Fourierkoeffizienten korrigieren. Außerdem liefert uns die Formel (5.22) jederzeit eine

genaue Fehlerabschätzung.

Ein wichtiges Resultat ist die Erkenntnis, daß die Signale, die über ein beliebiges RC-Glied gelaufen sind, fast uneingeschränkt zur Auswertung benutzbar sind. Das gilt, wenn man die Spektren der Grundkomponenten auf die gleiche Weise ermittelt. Um diese Gesetzmäßigkeiten genauer zu untersuchen, fassen wir die Überlegung in einen allgemeineren Rahmen.

Nach dem Ausdruck

$$y(\lambda) = \sum_{i=1}^{N} x_i \varphi_i(\lambda) \qquad [4.4]$$

erwarten wir, daß sich die gemessene Funktion $y(\lambda)$ als eine Linearkombination der Grundkomponenten $\varphi_v(\lambda)$ darstellt. Der Wellenlänge λ entspricht bei den elektrischen Signalen die Zeit t.

$$y(t) = \sum_{i=1}^{N} x_i \varphi_i(t) \qquad (5.27)$$

Man weiß, daß Funktionen, die im Lebesgueschen Sinne quadratisch summierbar sind, bereits den Axiomen des Hilbert-Raumes genügen, wenn die Metrik durch ein Skalarprodukt der Form

$$(f, g) = \int_{t_1}^{t_2} f^*(t) \cdot g(t)\, dt \qquad (5.28)$$

festgelegt wird.[92,138] $f^*(t)$ ist der konjugiert komplexe Wert zu $f(t)$. In dem Zeitraum $t_2 \leqq t \leqq t_1$ läuft das Spektrum ab, das wir für unsere Betrachtungen herausgreifen. Aus der Theorie des Hilbert-Raumes ergibt sich, daß man nach Wahl einer vollständigen und orthonormierten

Funktionenfolge

$$\{\psi_k(\lambda)\} \qquad (5.29)$$

eine eineindeutige Zuordnung zwischen den Elementen $y(t)$ des Hilbert-Raumes und den Zahlenfolgen $\{a_k\}$ hat. Dabei gilt

$$y(t) = \sum_{k=0}^{\infty} a_k \psi_k(t) \; . \qquad (5.30)$$

Aus

$$y(t) = \sum_{i=1}^{N} x_i \varphi_i(t) \qquad [5.27]$$

erhält man

$$\sum_{i=1}^{N} x_i \sum_{k=0}^{\infty} b_{ik} \psi_k(t) = \sum_{k=0}^{\infty} a_k \psi_k(t) \; . \qquad (5.31)$$

Bildet man auf beiden Seiten das innere Produkt mit $\psi_k(\lambda)$, so erhält man wegen der Orthonormiertheit der $\psi_k(\lambda)$

$$\sum_{i=1}^{N} x_i b_{ik} = a_k \; . \qquad (5.32)$$

Diese Beziehung gilt für jedes k.

Die linearen Transformationen im Hilbert-Raum sind additive und homogene Transformationen.

Wir zeigen, daß die Umwandlung der Meßsignale $E_1(t)$ in $E_2(t)$ eine lineare Transformation im Hilbert-Raum ist. Dazu betrachten wir den Ausdruck

$$E_2(t) = e^{-\frac{t-\xi}{RC}} \left(\eta + \int_{\xi}^{t} e^{\frac{t'-\xi}{RC}} \frac{d}{dt'} E_1(t')dt' \right) \; . \qquad [5.11]$$

Für $t-\xi >> RC$ ist der erste Summand vernachlässigbar, so daß wir die Beziehung

$$E_2(t) = e^{-\frac{t-\xi}{RC}} \int_{\xi}^{t} e^{\frac{t'-\xi}{RC}} \frac{d}{dt'} E_1(t')dt' \qquad (5.33)$$

erhalten. Das fortgelassene Glied beschreibt Einschwingvorgänge. Um das hier betrachtete Spektrum herauszunehmen, können wir solange warten bis die Bedingung $t-\xi >> RC$ erfüllt ist.

Um die Additivität zu zeigen, betrachten wir (5.33). Wir schreiben (5.33) in der abgekürzten Form

$$E_2(t) = L(E_1(t)) \ . \qquad (5.34)$$

Für $E_1(t)$ setzen wir die folgende Summe an

$$E_1(t) = f_1(t) + f_2(t) \ . \qquad (5.35)$$

Wir wollen die Additivität zeigen, das heißt

$$L(f_1(t) + f_2(t)) = L(f_1(t)) + L(f_2(t)) \ . \qquad (5.36)$$

Oder es ist zu zeigen, aus

$$E_2(t) = L(f_1(t) + f_2(t)) \qquad (5.37)$$

folgt

$$E_2(t) = L(f_1(t)) + L(f_2(t)) \ . \qquad (5.38)$$

Wir erhalten

$$E_2(t) = e^{-\frac{t-\xi}{RC}} \int_{\xi}^{t} e^{\frac{t'-\xi}{RC}} \frac{d}{dt'} \left(f_1(t') + f_2(t') \right) dt'$$

oder (5.39)

$$E_2(t) = e^{-\frac{t-\xi}{RC}} \int_{\xi}^{t} e^{\frac{t'-\xi}{RC}} \frac{d}{dt'} \left(f_1(t') \right) dt'$$

$$+ e^{\frac{t-\xi}{RC}} \int_{\xi}^{t} e^{\frac{t'-\xi}{RC}} \frac{d}{dt'} \left(f_2(t') \right) dt', \qquad (5.40)$$

$E_2(t) = L(f_1(t)) + L(f_2(t))$ q.e.d. [5.37]

Für die Homogenität haben wir die Gültigkeit der Beziehung

$$L(\alpha f_1(t)) = \alpha\, L(f_1(t)) \tag{5.41}$$

nachzuweisen. Aus (5.33) erhält man

$$e^{-\frac{t-\xi}{RC}} \int_{\xi}^{t} e^{\frac{t'-\xi}{RC}} \frac{d}{dt'} (\alpha f_1(t'))dt'$$
$$= \alpha\, e^{\frac{t-\xi}{RC}} \int_{\xi}^{t} e^{\frac{t'-\xi}{RC}} \frac{d}{dt'} (E_1(t'))dt' \,. \tag{5.42}$$

Damit ist gezeigt, daß es sich um eine lineare Transformation im Hilbert-Raum handelt. Bei einer linearen Transformation bleibt eine lineare Beziehung zwischen den Elementen erhalten.[91]

Wir wenden dies auf die Beziehung

$$y(t) = \sum_{i=1}^{N} x_i \varphi_i(t) \tag{5.27}$$

an. Wenn wir die Signale $y(t)$ und $\varphi_i(t)$ über ein RC-Glied schicken, so ändern sich diese Signale zwar zu $\hat{y}(t)$ und $\hat{\varphi}_i(t)$, aber es gilt weiter die Beziehung

$$\hat{y}(t) = \sum_{i=1}^{N} x_i \hat{\varphi}_i(t) \tag{5.43}$$

mit den gleichen Werten x_i. Wir brauchen keine Bedingung an die Größe des RC-Gliedes zu stellen. Die Bedingung ist nur, daß die Grundkomponenten $\varphi_i(t)$ mit dem gleichen RC-Glied aufgenommen werden. Dabei ist davon Gebrauch gemacht, daß es sich um einen hinreichend stationären Vorgang handelt, das heißt, daß sich die Spektren nicht ändern, andernfalls sind die bewiesenen Zusammenhänge nicht richtig.

5.2. Die Darstellungsmöglichkeiten der durch das RC-Glied gegebenen Transformation im Hilbert-Raum

In dem Ausdruck

$$E_2(t) = e^{-\frac{t-\xi}{RC}} \int_{\xi}^{t} e^{\frac{t'-\xi}{RC}} \frac{d}{dt'} E_1(t')\, dt' \qquad [5.33]$$

oder

$$E_2(t) = L(E_1(t)) \qquad [5.34]$$

liegt die lineare Transformation als kombinierter Differential- und Integraloperator vor.

Nach Wahl einer vollständigen und orthonormierten Funktionenfolge $\{\Psi_k(t)\}$ besteht eine eineindeutige Zuordnung zwischen den Funktionen $y(t)$ und den Zahlenfolgen $\{a_k\}$.

$$y(t) = \sum_{k=0}^{\infty} a_k \Psi_k(t) \qquad (5.44)$$

$$a_k = (\Psi_k, y) \qquad (5.45)$$

Dabei ist (Ψ_k, y) eine Abkürzung für das innere Produkt

$$(\Psi_k, y) = \int_{t_2}^{t_1} \Psi^*_k(t) y(t) dt \,. \qquad (5.46)$$

$\Psi^*_k(t)$ ist der konjugiert komplexe Wert von $\Psi_k(t)$.

Entsprechend kann man nach Wahl einer vollständigen und orthonormierten Funktionenfolge $\{\Psi_k(t)\}$ für einen linearen Operator L eine Matrizendarstellung

$$L_{\mu\nu} = (\Psi_\mu, L\Psi_\nu) \qquad (5.47)$$

angeben.[92] Dabei ist

$$(\psi_\mu, L\psi_\nu) = \int_{t_2}^{t_1} \psi_\mu^*(t) \cdot L(\psi_\nu(t))dt \qquad (5.48)$$

und

$$L(\psi_\nu(t)) = e^{-\frac{t-\xi}{RC}} \int_{\xi}^{t} e^{\frac{t'-\xi}{RC}} \frac{d}{dt'} \psi_\nu(t')dt' \,. \qquad (5.49)$$

Wir sind bemüht, das Funktionensystem $\{\psi_k(t)\}$ so zu wählen, daß die Matrix

$$\begin{pmatrix} L_{11} & L_{12} & L_{13} & L_{14} & \cdot & \cdot & \cdot \\ L_{21} & L_{22} & L_{23} & \cdot & \cdot & \cdot & \\ L_{31} & L_{32} & L_{33} & \cdot & \cdot & & \\ L_{41} & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & & \\ \cdot & \cdot & \cdot & & & & \end{pmatrix} \qquad (5.50)$$

für die Transformation L die einfache Gestalt einer Diagonalmatrix annimmt. Das erreicht man, wenn die Funktionen $\psi_k(t)$ Eigenfunktionen der Transformation L sind. Das heißt

$$L(\psi_k(t)) = \lambda_k \psi_k(t) \,. \qquad (5.51)$$

Aus

$$L_{\mu\nu} = (\psi_\mu, L\psi_\nu) \qquad (5.52)$$

folgt

$$L_{\mu\nu} = (\psi_\mu, \lambda_\nu \psi_\nu) \,. \qquad (5.53)$$

Es ergibt sich weiter aus der Orthogonalität der Funktionen $\psi_k(t)$ die Beziehung

$$L_{\mu\nu} = \lambda_\nu(\psi_\mu, \psi_\nu) = 0 \text{ für } \mu \neq \nu \,. \qquad (5.54)$$

Es handelt sich bei der Transformation L nicht um einen selbstadjungierten Operator. Wir können daher

leider nicht auf die zahlreichen Sätze über die Existenz von Eigenwerten und vollständige Systeme von Eigenfunktionen selbstadjungierter Operatoren zurückgreifen. Wir versuchen die Eigenwertgleichung

$$L(\Psi(t)) = \lambda \Psi(t) \tag{5.55}$$

zu lösen.

Ausgeschrieben ergibt diese Gleichung

$$\exp(-\tfrac{t-\xi}{RC})\left(\int_{\xi}^{t} \exp(\tfrac{t'-\xi}{RC})\, \tfrac{d}{dt'}\, \Psi(t')dt'\right) = \lambda \Psi(t) \tag{5.56}$$

oder

$$\int_{\xi}^{t} \exp(\tfrac{t'-\xi}{RC})\, \tfrac{d}{dt'}\, \Psi(t')dt' = \lambda \exp(\tfrac{t-\xi}{RC})\, \Psi(t)\ . \tag{5.57}$$

Wir differenzieren beide Seiten. Man beachte, daß die Lösungen der differenzierten Gleichung nicht notwendig Lösungen der undifferenzierten Gleichung zu sein brauchen. Andererseits sind aber alle Lösungen der undifferenzierten Gleichung auch Lösungen der differenzierten Gleichung

$$\exp(\tfrac{t-\xi}{RC})\tfrac{d}{dt}\Psi(t) = \lambda \exp(\tfrac{t-\xi}{RC})\tfrac{d}{dt}\Psi(t) + \tfrac{\lambda}{RC}\exp(\tfrac{t-\xi}{RC})\Psi(t)\ . \tag{5.58}$$

Es folgt

$$\tfrac{d}{dt}\Psi(t) + \tfrac{\lambda}{RC(\lambda-1)RC}\Psi(t) = 0\ . \tag{5.59}$$

Die allgemeinste Lösung dieser Differentialgleichung lautet[103]

$$\Psi(t) = k \exp \tfrac{-\lambda t}{(\lambda-1)RC}\ . \tag{5.60}$$

Als Eigenfunktionen kommen nur Exponentialfunktionen in Frage. Setzt man den Ansatz (5.60) in die Gleichung

(5.57) ein, so erkennt man, daß die Exponentialfunktionen asymptotische Lösungen für $\frac{t-\xi}{RC} \to \infty$ sind. Wie wir oben mehrfach erwähnt haben, abstrahieren wir von den Einschwingvorgängen, wir wählen $t-\xi >> RC$. Unter dieser Bedingung sind alle Exponentialfunktionen, für die $\lambda \neq RC$ ist, Eigenfunktionen des Operators L. Ein vollständiges und orthonormiertes Funktionensystem, was aus Exponentialfunktionen besteht, ist das komplexe Fouriersche Funktionensystem.[59]

$$\psi_k(t) = e^{\frac{1\pi k t}{T}} \quad \text{für } t_1 \leqq t \leqq t_2, \tag{5.61}$$

$T = t_2 - t_1$,

$k = 0, 1, -1, 2, -2, 3, -3, 4, -4.$

Die Matrizendarstellung

$$L_{\mu\nu} = (\psi_\mu, L\,\psi_\nu) \tag{5.62}$$

ergibt

$$L_{\mu\nu} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & & \\ 0 & \frac{1\pi CR}{1\pi CR+T} & 0 & 0 & 0 & & \\ 0 & 0 & \frac{1\pi CR}{1\pi CR-T} & 0 & 0 & & \\ 0 & 0 & 0 & \frac{1\pi CR}{1\pi CR+T/2} & 0 & & \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{1\pi CR}{1\pi CR-T/2} & & \\ & & & & & \ddots & \\ & & & & & & \frac{1\pi CR}{1\pi CR\pm T/k} \end{pmatrix}. \tag{5.63}$$

Die Elemente in der Diagonalen streben für wachsendes k gegen 1, physikalisch heißt das, daß hohe Frequenzen ohne irgend eine Änderung des RC-Gliedes passieren. Die

Bedeutung der Matrix erkennt man aus dem Folgenden. Man berechne die Entwicklung der Eingangsspannung am RC-Glied nach der Funktion $\Psi_k(t)$. Wir erhalten

$$E_1(t) = \sum_{\nu=0}^{\infty} c_\nu \Psi_\nu(t) \; . \tag{5.64}$$

Die Koeffizienten b_μ der entsprechenden Entwicklung der Ausgangsspannung erhält man aus den c_ν durch Matrizenmultiplikation

$$b_\mu = \sum_{\nu=0}^{\infty} L_{\mu\nu} c_\nu \; . \tag{5.65}$$

Damit ergibt sich

$$E_2(t) = \sum_{\mu=0}^{\infty} b_\mu \varphi_\mu(t) \; . \tag{5.66}$$

Aus der Theorie des Hilbert-Raumes weiß man, daß zu einem linearen Operator dann und nur dann der inverse Operator existiert, wenn $Lx = 0$ nur für $x = 0$ gilt.[92] Zu dem Operator L existiert kein inverser Operator. Dies erkennt man unmittelbar an der Darstellung von L; denn es gilt $L_{11}=0$. Das bedeutet, daß konstante Signale annulliert werden. Es gibt also ein $x \neq 0$, was auf das Nullelement abgebildet wird. L ist eine Abbildung des Hilbert-Raumes in sich. Sieht man aber von der ersten Komponente ab, so zeigt besonders die obige Darstellung von L mit den $L_{\mu\nu}$, daß die Transformation rückgängig zu machen ist.

Diese Überlegungen geben die Rechtfertigung für die früher ohne Begründung vorgenommene Entwicklung der Signale in eine komplexe Fourierreihe. Wir sahen, daß dieses Funktionensystem optimal für die Beschreibung der Transformation L ist.

Das wichtigste Resultat dieses Abschnittes Ist: Zur Berechnung der Konzentrationen eignen sich nicht nur die Spektren, sondern auch die durch ein beliebiges RC-Glied transformierten Signale. Darin ist speziell der Grenzfall der reinen Differentiation enthalten. Die Differentiation erhalten wir, wie oben genau ausgeführt wurde, wenn für alle wesentlich am Spektrum beteiligten Frequenzen ω_n die Beziehung

$$RC << \frac{1}{\omega_n} \qquad (5.67)$$

gilt.

Allgemeiner kann man noch sagen: Jede nur denkbare Veränderung der Signale, die sich als eine lineare Transformation der Signale herausstellt, verursacht keinen Fehler in der Berechnung der Konzentrationen. Bedingung dafür ist nur, daß die Grundkomponenten $\varphi_i(t)$ in gleicher Weise erfaßt werden und die lineare Unabhängigkeit der Grundkomponenten gewahrt bleibt.

.3. Unterschiede in den vorlaufenden und zurücklaufenden Signalen, die durch ein RC-Glied hervorgerufen werden

Das Rapidspektrophotometer ist so gebaut, daß jedes zweite Spektrum in umgekehrter Zeitfolge anfällt. Der mit 50Hz schwingende Spiegel erzeugt das Spektrum beim Schwingen in der einen Richtung in einer gewissen zeitlichen Reihenfolge. Beim Zurückschwingen erzeugt der Spiegel das Spektrum in umgekehrter zeitlicher Reihenfolge.

Wir nehmen an, daß die Signale bis auf die Zeitumkehr

gleich sind, das heißt

$$E_1(t) = \begin{cases} f(t) \text{ für } t_1 \leqq t \leqq t_2 \text{ (Hinschwingen des Spiegels)} \\ f(t_3+t_1-t) \text{ für } t_2 \leqq t \leqq t_3 \text{ (Rückschwingen des Spiegels),} \end{cases}$$

$$\text{dabei ist } t_2-t_1 = t_3-t_2 . \qquad (5.68)$$

Es soll untersucht werden, wie weit die Signale sich unterscheiden, wenn sie zuvor über ein RC-Glied gelaufen sind.

Dazu betrachten wir die Darstellung von $E_1(t)$ in eine Fourierreihe

$$E_1(t) = \sum_{n=0}^{\infty} c_n e^{i\omega_n(t-t_1)} + \sum_{n=-1}^{-\infty} c_n e^{i\omega_n(t-t_1)}, \qquad (5.69)$$

$$\omega_n = \frac{2\pi \cdot n}{T} , \qquad (5.70)$$

$$T = t_3-t_1 = 2(t_2-t_1) . \qquad (5.71)$$

Hinter dem RC-Glied erhalten wir den Ausdruck

$$E_2(t) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{i\omega_n}{i\omega_n + \frac{1}{RC}} c_n e^{i\omega_n(t-t_1)} + \sum_{n=-1}^{-\infty} \frac{i\omega_n}{i\omega_n + \frac{1}{RC}} c_n e^{i\omega_n(t-t_1)} . \qquad [5.17]$$

Wir errechnen uns die Differenz der Signale des Vor- und Rücklaufes. Wir erhalten

$$E_2(t)-E_2(2t_2-t) \text{ für } t_1 \leqq t \leqq t_2, \qquad (5.72)$$

$$E_2(t)-E_2(2t_2-t) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{i\omega_n}{i\omega_n + \frac{1}{RC}} c_n e^{i\omega_n(t-t_1)} + \sum_{n=-1}^{-\infty} \frac{i\omega_n}{i\omega_n + \frac{1}{RC}} c_n e^{i\omega_n(t-t_1)} - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{i\omega_n}{i\omega_n + \frac{1}{RC}} c_n e^{i\omega_n(2t_2-t-t_1)} - \sum_{n=-1}^{-\infty} \frac{i\omega_n}{i\omega_n + \frac{1}{RC}} c_n e^{i\omega_n(2t_2-t-t_1)} . \qquad (5.73)$$

Wir betrachten den Exponenten der 3. und 4.Summe. Es gilt

$$2t_2-t-t_1 = 2(t_2-t_1)-(t-t_1)\,. \tag{5.74}$$

$T = 2(t_2-t_1)$ ist die Periode der Funktion $E_2(t)$, das heißt, der Exponent der 3. und 4.Summe kann auf $-i\omega_n(t-t_1)$ reduziert werden. c_n sind die Fourierkoeffizienten von $E_1(t)$. Da wir $E_1(t)$ rein reellwertig annehmen dürfen, ist

$$c_n = c_{-n}\,. \tag{5.75}$$

Bedenken wir, daß

$$\omega_n = -\omega_{-n} \tag{5,76}$$

gilt, so ergibt sich als Differenz der vor- und rücklaufenden Signale die Beziehung

$$E_2(t)-E_2(2t_2-t) = \sum_{n=1}^{\infty} c_n\left(\frac{i\omega_n}{i\omega_n+\frac{1}{RC}} - \frac{i\omega_n}{i\omega_n-\frac{1}{RC}}\right) \cdot\left(e^{i\omega_n(t-t_1)} - e^{-i\omega_n(t-t_1)}\right) \tag{5.77}$$

oder

$$E_2(t)-E_2(2t_2-t) = \sum_{n=1}^{\infty} -4c_n\frac{\omega_n RC}{1+\omega_n^2 RC^2}\sin\omega_n(t-t_1). \tag{5.78}$$

Für

$RC\omega_n >> 1$ folgt

$$E_2(t)-E_2(2t_2-t) = \sum_{n=1}^{\infty}\frac{-4c_n}{\omega_n RC}\sin\omega_n(t-t_1) \tag{5.79}$$

mit

$$\omega_n = \frac{2\pi n}{T}\,, \tag{5.80}$$

$$T = \frac{1}{50}\ \mathrm{s} \tag{5.81}$$

und

$$\omega_n = 314\ n\ s^{-1} \quad . \tag{5.82}$$

Mögliche Werte für R und C, die in unserem Photometer benutzt werden, sind

$$R = 1\,M\Omega \tag{5.83}$$

und

$$C = 1\,\mu F \quad . \tag{5.84}$$

Aus (5.79) ergibt sich

$$E_2(t)-E_2(2t_2-t) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{-4c_n}{314\,n} \sin\omega_n(t-t_1) \quad . \tag{5.85}$$

Danach hat man größenordnungsmäßig 1% Unterschied für das hin- und rücklaufende Spektrum zu erwarten. Dieser Unterschied wird durch die Benutzung des RC-Gliedes verursacht.

Beschränkt man sich auf das vor- oder zurücklaufende Spektrum und ermittelt auch die Grundkomponenten in der gleichen Weise, so wird man durch das RC-Glied keinen zusätzlichen Fehler bei der Berechnung der Konzentrationen erhalten.

5.4. Die Auswertung der Spektren bei RC-Kopplung

Wir haben beschrieben, welchen Einfluß das RC-Glied auf das Signal hat. Jetzt erhebt sich die Frage, wie man bei der Auswertung der Spektren mit der unbekannten additiven Größe K fertig wird. Wir messen statt des Wertes $y(\lambda)$ den Wert

$$\hat{y}(\lambda) = y(\lambda) + K \tag{5.86}$$

Mit (4.4) erhält man

$$\hat{y}(\lambda) = \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) + K \,. \qquad (5.87)$$

Wir werden hier drei Verfahren beschreiben, mit deren Hilfe man die Konstante K berechnen beziehungsweise eliminieren kann. Kann man die Signale der Summenspektren und der Grundkomponenten mit dem gleichen RC-Glied aufnehmen, so ist das, wie gezeigt, eine lineare Transformation der Signale, die auf den Gang der Auswertung überhaupt keinen Einfluß hat. Warum diese so einfach scheinende Lösung des Problems nicht ideal ist, wird am Ende des Kapitels erläutert.

Hat das Spektrum isosbestische Wellenlängen, das sind solche Wellenlängen, bei denen die Extinktion konstant bleibt, wenn sich der Redoxzustand ändert, so kann man daraus die Konstante K relativ einfach bestimmen. Auf die isosbestischen Wellenlängen gehen wir unten näher ein.

Die dritte Methode besteht darin, daß wir die Konstante K als eine weitere Komponente

$$K = x_0 \varphi_0(\lambda) \qquad (5.88)$$

ansehen, dabei ist

$$\varphi_0(\lambda) \equiv 1 \,. \qquad (5.89)$$

Damit lautet die Gleichung (5.87)

$$\hat{y}(\lambda) = \sum_{\nu=0}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) \qquad (5.90)$$

Aus einem N-Komponentensystem wird ein N+1-Komponen-

tensystem. Die Lösung eines N+1-Komponentensystems ist, wie in dem 4.Kapitel dargestellt wurde, in der Form

$$x_\nu = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} y(\lambda)\, g_\nu(\lambda)\, d\lambda \quad \text{für } \nu = 0 \text{ bis } N \qquad [4.91]$$

möglich. Da die Größe x_o nicht interessiert, brauchen wir das Integral

$$x_o = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} y(\lambda)\, g_o(\lambda)\, d\lambda \qquad (5.91)$$

auch nicht auszurechnen. Das heißt, wir benötigen nicht mehr Rechenzeit bei der Auswertung während des Versuches. Wir brauchen nur x_1 bis x_N auszurechnen. Das ist sehr wesentlich, weil wir Schwierigkeiten haben, mit der Auswertung während der Messung schrittzuhalten (siehe 6.Kapitel). Bei der Berechnung der Funktionen $g_\nu(\lambda)$ geht die weitere Komponente $x \cdot \varphi_o$ sehr wohl ein. Da die Berechnung der Funktionen $g_\nu(\lambda)$ vor dem Versuch geschieht, besteht darin kein Problem.

Bei der Auswertung der Spektren mit einer digitalen Rechenmaschine dürfte dieses Verfahren die beste Methode sein. Für die Berücksichtigung der Nullpunktsverschiebung werden alle Meßpunkte mit herangezogen. Es wird damit das Verfahren benutzt, das auch hier die kleinsten Fehler für die zu errechnenden Konzentrationen erwarten läßt (siehe 4.Kpitel). Wir brauchen für die Auswertung während der Messung keine zusätzliche Rechenzeit, und wir brauchen keine Kenntnisse über die Existenz und die Lage von isosbestischen Punkten.

Besonders für die Reflexionsphotometrie empfiehlt es sich, noch eine entsprechende Erweiterung des Ansatzes (5.87) zu machen. Wir fügen wegen der Streuung (siehe Gleichung (5.2))des Lichtes eine weitere Komponente $x_1 \varphi_1(\lambda)$ hinzu

$$y(\lambda) = \sum_{\nu=0}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) + x_1 \varphi_1(\lambda) . \qquad (5.92)$$

Dabei sei $\varphi_1(\lambda)$ eine homogene und lineare Funktion von λ. Wir erhalten

$$x_1 \varphi_1(\lambda) = x_1 \cdot \alpha \cdot \lambda . \qquad (5.93)$$

Was zur Auswertung mit einer digitalen Rechenmaschine zu sagen ist, entspricht genau dem, was wir eben über die Komponente $x_0 \varphi_0$ gesagt haben.

5.5. Isosbestische Wellenlängen

Von einer isosbestischen Wellenlänge eines Stoffes oder Stoffgemisches sprechen wir, wenn die Extinktion nicht vom Oxydationsgrad der einzelnen Stoffe abhängt.

Wir betrachten das Mehrkomponentensystem

$$y(\lambda) = \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) \qquad [4.4]$$

und nehmen an, daß die N/2 Stoffe in verschiedenen Redoxzuständen in der Probe enthalten sind. Es sei $\varphi_1(\lambda)$ das Spektrum des vollreduzierten 1.Stoffes, $\varphi_2(\lambda)$ das Spektrum des volloxydierten 1.Stoffes und entsprechend $\varphi_{2\mu-1}(\lambda)$ das Spektrum des vollreduzierten μ. Stoffes,

$\varphi_{2\mu}(\lambda)$ das Spektrum des volloxydierten μ.Stoffes für $\mu = 1$ bis N/2. Wir führen statt der Konzentrationen x_ν die Gesamtkonzentrationen c_μ und die Oxydationsgrade α_μ ein. Dabei berechnen sich die Gesamtkonzentrationmwie folgt

$$c_\mu = x_{2\mu-1} + x_{2\mu} \quad \text{für} \quad \mu = 1 \text{ bis } N/2 . \tag{5.94}$$

$$\alpha_\mu = \frac{x_{2\mu}}{c_\mu} \quad \text{für} \quad \mu = 1 \text{ bis } N/2 \tag{5.95}$$

ist der Oxydationsgrad der μ.Komponente. Aus den Beziehungen (5.94) und (5.95) folgt

$$x_{2\mu} = c_\mu \alpha_\mu \quad \text{für} \quad \mu = 1 \text{ bis } N/2 \tag{5.96}$$

und

$$x_{2\mu-1} = c_\mu (1-\alpha_\mu) \text{ für } \mu = 1 \text{ bis } N/2 . \tag{5.97}$$

Benutzt man die letzten beiden Gleichungen, so folgt aus (4.4) der Ausdruck

$$y(\lambda) = \sum_{\mu=1}^{N/2} c_\mu (1-\alpha_\mu) \varphi_{2\mu-1}(\lambda) + c_\mu \alpha_\mu \varphi_{2\mu}(\lambda) . \tag{5.98}$$

Wir suchen solche Wellenlängen λ_i, für die $y(\lambda)$ nicht von den Oxydationsgraden α_μ abhängen. Die Bedingung dafür ist, daß die partiellen Ableitungen nach α_μ verschwinden. Also

$$\frac{\partial y(\lambda)}{\partial \alpha_\mu} = 0 \quad \text{für} \quad \mu = 1 \text{ bis } N/2 \tag{5.99}$$

oder

$$\frac{\partial}{\partial \alpha_\mu}\left(\sum_{\mu=1}^{N/2} c_\mu(1-\alpha_\mu)\varphi_{2\mu-1}(\lambda) + c_\mu \alpha_\mu \varphi_{2\mu}(\lambda)\right) = 0 \quad , \qquad \mu = 1 \text{ bis } N/2. \tag{5.100}$$

Ausgerechnet erhalten wir

$$c_\mu \varphi_{2\mu}(\lambda) - c_\mu \varphi_{2\mu-1}(\lambda) = 0 \text{ für } \mu = 1 \text{ bis } N/2 \tag{5.101}$$

oder

$$\varphi_{2\mu}(\lambda) = \varphi_{2\mu-1}(\lambda) \quad \text{für} \quad \mu = 1 \text{ bis } N/2 \; . \tag{5.102}$$

Für die isosbestischen Wellenlängen müssen die Extinktionen der Grundkomponenten jeweils für den oxydierten und reduzierten Zustand übereinstimmen. Bei einem Stoff, der oxydiert oder reduziert sein kann, ist es durchaus zu erwarten, daß solche isosbestischen Wellenlängen existieren. Bei einem Gemisch von mehreren Stoffen ist es sehr viel unwahrscheinlicher, denn die isosbestischen Punkte der einzelnen Komponenten müssen zusammenfallen, damit es zu isosbestischen Wellenlängen des Gemisches kommt. Bei Gemischen kann es zu isosbestischen Wellenlängen kommen, wenn die Absorptionsbanden der einzelnen Komponenten isoliert liegen bei sonst ~~zu~~ vernachlässigbarer Grundabsorption oder wenn die Oxydationsgrade aller Stoffe in der Probe annähernd gleich sind. Das heißt, wenn

$$\alpha = \alpha_\mu \quad , \quad \mu = 1 \text{ bis } N/2 \; , \tag{5.103}$$

gilt. Damit lautet die Gleichung (5.98)

$$y(\lambda) = \sum_{\mu=1}^{N/2} c_\mu(1-\alpha)\varphi_{2\mu-1}(\lambda) + c_\mu \alpha \varphi_{2\mu}(\lambda) \; . \tag{5.104}$$

Die Bedingung für isosbestische Wellenlängen ist in diesem Falle, daß $y(\lambda)$ unabhängig von α sein soll, das heißt

$$\frac{\partial y(\lambda)}{\partial \alpha} = 0 \qquad (5.105)$$

oder

$$\frac{\partial}{\partial \alpha}\left(\sum_{\mu=1}^{N/2} c_\mu (1-\alpha)\varphi_{2\mu-1}(\lambda) + c_\mu \alpha \varphi_{2\mu}(\lambda) \right) = 0 . \qquad (5.106)$$

Ausgerechnet erhalten wir

$$\sum_{\mu=1}^{N/2} c_\mu \varphi_{2\mu}(\lambda) - c_\mu \varphi_{2\mu-1}(\lambda) = 0 . \qquad (5.107)$$

Diese Beziehung ist gleichbedeutend mit

$$\sum_{\mu=1}^{N/2} c_\mu \varphi_{2\mu}(\lambda) = \sum_{\mu=1}^{N/2} c_\mu \varphi_{2\mu-1}(\lambda) . \qquad (5.108)$$

Nur wenn das Mischungsverhältnis der einzelnen Komponeten, zum Beispiel in dem Gewebe eines speziellen Organs, konstant ist, wird man unter diesen Voraussetzungen reproduzierbare isosbestische Punkte erwarten können. Ändert sich das Mischungsverhältnis der einzelnen Komponenten, so werden sich die isosbestischen Wellenlängen ändern.

Streng genommen kann man isosbestische Punkte nur erwarten, wenn alle Komponenten stets den gleichen Oxydationsgrad haben oder wenn die Stoffe isolierte Absorptionsbanden aufweisen. Ist das nicht der Fall, so arbeitet man mit einer mehr oder minder guten Näherung. Vorsicht

ist geboten bei Vorgängen, die so schnell ablaufen, daß sich kein einheitlicher Oxydationsgrad der einzelnen Komponenten ausbilden kann. Das gilt nur, wie gesagt, wenn außerdem die Absorptionsbanden nicht weitgehend isoliert liegen.

Weiß man, in welchem Verhältnis die Komponenten in der Probe vorliegen und haben alle Komponenten annähernd den gleichen Oxydationsgrad, so kann man aus den Extinktionswerten von zwei isosbestischen Wellenlängen eine unbekannte konstante Komponente errechnen. Wir betrachten die Beziehung

$$y(\lambda) = \sum_{\mu=1}^{N/2} c_\mu (1-\alpha) \varphi_{2\mu-1}(\lambda) + c_\mu \alpha \varphi_{2\mu}(\lambda) \qquad [5.104]$$

für die beiden isosbestischen Wellenlängen

$$\lambda_i,\ i = \text{I und II} \qquad (5.109)$$

Wir erhalten

$$y(\lambda_i) = \sum_{\mu=1}^{N/2} c_\mu (1-\alpha) \varphi_{2\mu-1}(\lambda_i) + c_\mu \alpha \varphi_{2\mu}(\lambda_i) . \qquad (5.110)$$

Unter Benutzung des Ausdruckes (5.102) erhält man weiter

$$y(\lambda_i) = \sum_{\mu=1}^{N/2} c_\mu \varphi_{2\mu}(\lambda_i) \qquad (5.111)$$

oder

$$y(\lambda_i) = c_1 \sum_{\mu=1}^{N/2} \frac{c_\mu}{c_1} \varphi_{2\mu}(\lambda_i) . \qquad (5.112)$$

Da die Mischungsverhältnisse $\frac{c_\mu}{c_1}$ der einzelnen Kompo-

nenten als konstant und bekannt angenommen werden, sind die Größen

$$\varrho(\lambda_i) = \sum_{\mu=1}^{N/2} \frac{c_\mu}{c_1} \varphi_{2\mu}(\lambda_i) \qquad (5.113)$$

konstant und bekannt. Das mit einem RC-Glied aufgenommene Spektrum sei

$$\hat{y}(\lambda) = y(\lambda) + K \; . \qquad [5.86]$$

Mit (5.112) und (5.113) ergibt sich

$$\hat{y}(\lambda_i) = c_1 \varrho(\lambda_i) + K \; . \qquad (5.114)$$

Aus zwei derartigen Beziehungen i = I und i = II erhalten wir

$$K = \hat{y}(\lambda_I) - \left(\frac{\hat{y}(\lambda_I) - \hat{y}(\lambda_{II})}{\varrho(\lambda_I) - \varrho(\lambda_{II})} \right) \varrho(\lambda_I) \qquad (5.115)$$

oder

$$K = \left(1 - \frac{\varrho(\lambda_I)}{\varrho(\lambda_I) - \varrho(\lambda_{II})}\right) \hat{y}(\lambda_I) + \frac{\varrho(\lambda_I)}{\varrho(\lambda_I) - \varrho(\lambda_{II})} \hat{y}(\lambda_{II}) \qquad (5.116)$$

Mit

$$B = \frac{\varrho(\lambda_I)}{\varrho(\lambda_I) - \varrho(\lambda_{II})} \qquad (5.117)$$

und

$$A = 1 - B \qquad (5.118)$$

folgt

$$K = A\, \hat{y}(\lambda_I) + B\, \hat{y}(\lambda_{II}) \qquad (5.119)$$

Um das Spektrum $y(\lambda)$ für die weitere Auswertung zu bekommen, muß man vom gemessenen Spektrum $\hat{y}(\lambda)$ die Konstante K abziehen. So ergibt sich

$$y(\lambda) = \hat{y}(\lambda) - \left(A\hat{y}(\lambda_I) + B\,\hat{y}(\lambda_{II}) \right). \qquad (5.120)$$

Wenn man die Auswertung mit einer digitalen Rechenmaschine vornimmt, so kosten diese Rechenoperationen Zeit, was bei dem oben beschriebenen Verfahren nicht der Fall war. Außerdem dürfte dieses Verfahren wesentlich ungenauer sein. Deshalb wird diese Methode vorwiegend der Auswertung geschriebener oder photographierter Spektren vorbehalten sein. Dabei bietet das Verfahren große Vorteile wegen seiner Einfachheit.

Isosbestische Punkte bei RC-Kopplung

Bei Spektren, die mit Hilfe einer RC-Kopplung aufgenommen wurden, existieren "scheinbare isosbestische" Wellenlängen. Damit sind solche Wellenlängen gemeint, bei denen sich der gemessene Wert nicht ändert, wenn sich der Oxydationsgrad ändert. Diese "scheinbaren isosbestischen" Punkte hängen vom gemessenen Spektralintervall ab. Es sei

$$y(\lambda) = \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) \qquad [4.4]$$

die Extinktion der betrachteten Probe. Man mißt mit einem RC-Glied, bei dem $RC \gg \frac{1}{\omega_n}$, ($\omega_n$ sind die Fourierfrequenzen von $y(\lambda)$), ein um einen konstanten Summanden K verschobenes Spektrum $\hat{y}(\lambda)$. Das Spektrum wird so verschoben, daß das Integral über das Spektrum

verschwindet (siehe (5.26)). Wir messen

$$\hat{y}(\lambda) = \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) - \frac{1}{\lambda_2-\lambda_1} \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \varphi_\nu(w)\, dw . \tag{5.121}$$

Wie man leicht nachrechnen kann, ist dabei

$$\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \hat{y}(\lambda)\, d\lambda = 0 . \tag{5.122}$$

Indem wir den Ausdruck (5.121) umformen, erhalten wir

$$\hat{y}(\lambda) = \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \left(\varphi_\nu(\lambda) - \frac{1}{\lambda_2-\lambda_1} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \varphi_\nu(w)\, dw \right) \tag{5.123}$$

oder

$$\hat{y}(\lambda) = \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \hat{\varphi}_\nu(\lambda) \tag{5.124}$$

mit

$$\hat{\varphi}_\nu(\lambda) = \varphi_\nu(\lambda) - \frac{1}{\lambda_2-\lambda_1} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \varphi_\nu(w)\, dw . \tag{5.125}$$

Die Beziehung (5.124) entspricht dem oben genauer mit Hilfe der Theorie des Hilbert-Raumes nachgewiesenen Sachverhalt, daß die Grundfunktionen und die Signale sich ändern, wenn diese über ein RC-Glied laufen, aber daß eine lineare Beziehung zwischen den Funktionen erhalten bleibt.

Das hat hier, wie schon erwähnt, die sehr wichtige Konsequenz, daß man sich um die Nullpunktsverschiebung überhaupt nicht zu kümmern braucht, wenn man Grundfunktionen und Spektrum mit demselben RC-Glied aufnimmt und stets das gleiche Wellenlängenintervall betrachtet.

Man kann alle Überlegungen, die die isosbestischen Punkte betreffen, auch mit den Funktionen $\hat{\varphi}_\nu(\lambda)$ durchführen. Das ist besonders wesentlich für die Überlegungen und Berechnungen inhomogener Farbstoffverteilungen. (Siehe 7.Kapitel.) Bei der Berechnung der Konzentrationen, dem Redoxzustand oder wie hier bei der Berechnung der Nullpunktsverschiebung kennen wir Methoden, bei denen wir auch ohne isosbestische Wellenlängen auskommen. Das gilt aber nicht mehr, wenn inhomogene Farbstoffverteilungen vorliegen.

Die isosbestischen Punkte der Spektren $\hat{y}(\lambda)$ werden allerdings von dem gemessenen Wellenlängenintervall $\lambda_2 - \lambda_1$ abhängen. Man kann die Lage der isosbestischen Punkte sich auf diese Weise sogar in gewissen Grenzen selbst wählen. Geht die Änderung des Redoxzustandes mit einer starken Änderung des Mittelwertes der Extinktion einher, so ist es möglich, daß die Spektren $y(\lambda)$ keine isosbestischen Wellenlängen besitzen, aber sehr wohl die mit Wechselstromkopplung aufgenommenen Spektren $\hat{y}(\lambda)$.

Zeitliche Änderung der Spektren bei RC-Kopplung

Wir haben in den vorausgegangenen Abschnitten stets den Fall behandelt, daß sich die Spektren während der betrachteten Zeitintervalle nicht ändern.

Ändern sich die Spektren, so können wir bei der Fourierentwicklung (5.12) annehmen, daß die Koeffizienten c_n Funktionen der Zeit sind. Wir erhalten

$$E_1(t) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} c_n(t)\, e^{i\omega_n t} . \qquad (5.126)$$

Für $t - \xi >> RC$ gilt am Ausgang des RC-Gliedes die Beziehung

$$E_2(t) = e^{-\frac{t-\xi}{RC}} \int_{\xi}^{t} e^{\frac{t'-\xi}{RC}} \frac{dE_1(t')}{dt'} dt' . \quad [5.33]$$

Aus den letzten beiden Formeln kann man sich jederzeit die Ausgangsspannungen am RC-Glied errechnen. Wir wollen hier einige Spezialfälle betrachten. Die Funktion am Eingang des RC-Gliedes sei $E_1(t)$. Dieses Spektrum ändere sich bis zur Zeit $t = 0$ in das Spektrum $\hat{E}_1(t)$. Die Spannung $E_2(t)$ am Ausgang des RC-Gliedes lautet dann für $t > 0$

$$E_2(t) = \hat{E}_2(t) - e^{-\frac{t}{RC}} \int_{\xi}^{0} e^{\frac{t'}{RC}} \frac{dE_1(t')}{dt'} dt'$$

mit

(5.127)

$$\hat{E}_2(t) = e^{-\frac{t-\xi}{RC}} \int_{\xi}^{t} e^{\frac{t'-\xi}{RC}} \frac{dE_1(t')}{dt'} dt' . \quad (5.128)$$

Diese Formeln ergeben sich aus dem Ausdruck (5.11). Die Formel (5.127) besagt, daß, wenn sich das Spektrum geändert hat, sofort der neue Wert $\hat{E}_2(t)$ anliegt, überlagert von einem Summanden, der mit $e^{-t/RC}$ exponentiell abklingt. Wir haben oben gesehen, daß ein möglicher Wert für das Produkt

$$R\,C = 1s \quad (5.129)$$

beträgt. Mit diesem Wert von RC finden wir, daß der Summand

$$e^{\frac{-t}{RC}} \int_{\xi}^{0} e^{\frac{t'}{RC}} \frac{dE_1(t')}{dt'} dt' \quad (5.130)$$

erst nach 2,3s auf 1/10 und nach der doppelten Zeit auf 1/100 des Ausgangswertes abgeklungen ist.

Hier bietet sich zumindest theoretisch eine Möglichkeit an, die Fehler, die auftreten, zu eliminieren. Wir fügen als eine weitere unbekannte Komponente bei der Auswertung einen Summanden

$$x_{RC} \cdot e^{\frac{-t}{RC}} \qquad (5.131)$$

hinzu. Das ist möglich, da wir den Wert von RC kennen. Da wir den Wert x_{RC} nicht wissen möchten, benötigen wir dazu keine zusätzliche Rechenzeit während der Messung. Im übrigen gilt das Gleiche, was wir oben anläßlich einer zusätzlichen konstanten Komponente gesagt haben. Praktisch hat die Funktion $x_{RC}\ e^{-t/RC}$ keine Bedeutung, da bei einem RC-Wert von

$$R\,C = 1s \qquad [5.129]$$

die Funktion $e^{-t/RC}$ während der Aufnahme eines Spektrums sich so wenig ändert, daß die Funktion $e^{-t/RC}$ als konstant anzusehen ist. Wir eliminieren bei Auswertungen sowieso eine konstante Komponente beziehungsweise eine lineare Funktion.

Als weiteren Fall betrachten wir, daß $E_1(t)$ bei $t = 0$ einen Sprung K_o enthält. In Formeln geschrieben heißt das, daß

$$E_1(t) = \tilde{E}_1(t) \quad \text{für } t < 0 \qquad (5.132)$$

und

$$E_1(t) = \tilde{E}_1(t) + K_o \quad \text{für } t > 0\ . \qquad (5.133)$$

Der Fall ist nur durch die Benutzung von verallgemeinerten Funktionen[59] zu behandeln.

Aus der Gleichung (5.11) ersieht man, daß auch die Spannung $E_2(t)$ am Ausgang einen Sprung der Größe K_o aufweist. Wir erhalten

$$E_2(t) = \tilde{E}_2(t) \quad \text{für } t < 0 \tag{5.134}$$

und

$$E_2(t) = \tilde{E}_2(t) + K_o\, e^{-t/RC} \quad \text{für } t > 0\,. \tag{5.135}$$

Eine konstante Verschiebung des Spektrums wird von $E_2(t)$ mitgemacht. Diese Änderung klingt mit der Zeitkonstanten RC exponentiell ab. Sprünge mit einer verschwindenden Resultanten, die in einer Zeit $t \ll RC$ erfolgen, haben auf den weiteren Verlauf der Spektren kaum einen Einfluß. Verschwindet die Resultante nicht, so wird auch das Spektrum erst in dem Gesamtbetrag des resultierenden Sprunges erhöht oder vermindert sein. Diese Verschiebung klingt mit der Zeitfunktion $e^{-t/RC}$ ab. Wir können diesen Gedanken weiter verfolgen und kommen so zu dem wichtigen Resultat:

Eine Änderung eines Spektrums wird sich nur dann auf die folgenden Spektren auswirken, wenn sich der Mittelwert über das gesamte Spektrum geändert hat. Die folgenden Spektren sind erst um den Wert der Mittelwertsänderung erhöht. Diese Änderung klingt mit der Exponentialfunktion $e^{-t/RC}$ ab. Es ist möglich, die Änderung für die Dauer eines Spektrums als konstant anzusehen, wenn $RC \gg 0{,}01\text{s}$. 0,01s ist, wie schon erwähnt, die Zeit, in

der ein Spektrum gemessen wird.

Es ist Vorsicht geboten bei dem oben angegebenen Auswertverfahren, bei dem man die Grundfunktion und das Spektrum so normiert, daß die Mittelwerte verschwinden und man dann bei der Auswertung keine konstante Komponente zu berücksichtigen braucht. Die Vorsicht ist geboten, da der Mittelwert über das mit einem RC-Glied aufgenommene Spektrum nicht Null ist, wenn gerade vorher eine Änderung des Mittelwertes erfolgte.

6.Kapitel

Die Auswertung von Mehrkomponentenspektren mit Hilfe von digitalen und hybriden Rechenmaschinen

6.1. Die Auswertung während der Messung mit einer digitalen Rechenmaschine

24000 Meßwerte fallen in der Sekunde mit dem Rapidspektrophotometer an. Das Ziel ist, die Auswertung möglichst während der Messung durchzuführen; denn dann entstehen keine zusätzlichen Fehler durch die Meßwertspeicherung, und man hat die Möglichkeit, an Hand der Ergebnisse die ablaufenden Prozesse zu steuern. Andererseits sollte das Auswertverfahren so sein, daß alle gemessene Information über die Konzentrationen der Farbstoffe erfaßt wird. Im dritten Kapitel wurde durch das Verfahren zur Errechnung der Konzentrationen mit dem kleinsten zu erwartenden Fehler beschrieben. Hier sollen die Ergebnisse und Probleme, die bei der Durchführung des Verfahrens mit einem elektronischen Rechner sich ergaben, behandelt werden. Die zugehörigen Rechenmaschinenprogramme befinden sich im Anhang dieser Arbeit. Das wesentliche Problem besteht darin, daß man nur 4 μs je Meßwert zur Auswertung zur Verfügung hat.

Wir behandeln hier den Fall, wie er bei der rein multiplikativen Farbmischung auftritt, daß die gemessenen Summenspektren $y(\lambda)$ sich als eine Linearkombination

$$y(\lambda) = \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) \qquad [4.4]$$

aus den Grundkomponenten $\varphi_\nu(\lambda)$ ergeben. Das im vierten Kapitel beschriebene Auswertverfahren hatte zum Ergebnis, daß sich die Konzentrationen x_ν als Skalarprodukte

$$x_\nu = (y,h_\nu), \quad \nu = 1 \text{ bis } N, \qquad [4.88]$$

errechnen lassen. Damit ist auch für das Vorhaben der "zeitoptimalen" Auswertung ein wesentliches Ergebnis gewonnen. Die Auswertung ist in zwei Teile zerlegt worden. Der erste Teil, der die meiste Zeit in Anspruch nimmt, nämlich die Berechnung der Funktionen $h_\nu(\lambda)$, kann vor dem Versuch erfolgen. Nur der zweite Teil der Auswertung, die Bildung der Skalarprodukte (4.88), muß während der Messung erfolgen.

Bei Systemen von mehr als drei Komponenten berechnen wir die Funktionen $h_\nu(\lambda)$ einige Tage vor dem Versuch mit der TR4 der Marburger Rechenanlage (siehe Programm 68-1-D23).

Erfolgt die Messung der Spektren an M Extinktionswerten y_i, so erhält man für die Skalarprodukte (4.88) mit der Definition (4.71) den Ausdruck

$$x_\nu = \frac{1}{\sum_{i=1}^{M} \alpha_i} \sum_{i=1}^{M} y_i h_{i\nu} \alpha_i, \quad \nu = 1 \text{ bis } N. \qquad (6.1)$$

Mit der Abkürzung

$$g_{i\nu} = \frac{1}{\sum_{i=1}^{M} \alpha_i} h_{i\nu} \alpha_i, \quad \nu = 1 \text{ bis } N, \qquad (6.2)$$

ergibt sich

$$x_\nu = \sum_{i=1}^{M} y_i g_{i\nu}, \quad \nu = 1 \text{ bis } N. \qquad (6.3)$$

Zur Berechnung von N Konzentrationen x_ν sind N Produktsummen der Form (6.3) zu bilden. Bei unserem Rapidspektrophotometer beträgt die Zahl der Meßpunkte M = 227.

6.11. Die Auswertung mit dem Rechner PDP8

Für die Auswertung eines Spektrums sind 227·N Produkte zu bilden (siehe (6.3)). Außerdem hat man die gleiche Zahl an Additionen durchzuführen.

Jedes zweite Spektrum erhalten wir in umgekehrter zeitlicher Reihenfolge. Zur Zeit verzichten wir noch auf die Auswertung jedes zweiten Spektrums, da dies wegen der Zeitumkehr zu große technische Schwierigkeiten bereitet. Wie im fünften Kapitel dargelegt wurde, kommt es leicht zu Unterschieden in zwei aufeinanderfolgenden Spektren, die durch die Zeitumkehr bedingt sind. Zum Beispiel verursacht die Wechselstromkopplung mit einem ungenügend dimensionierten RC-Glied einen derartigen Unterschied. Es entsteht, wie gezeigt, kein Fehler bei der Ausrechnung der Konzentrationen, wenn man die Summenspektren und die Grundkomponenten in gleicher Weise erfaßt. Wollte man alle Spektren auswerten, so müßte man auch die Grundkomponenten in beiden zeitlichen Reihenfolgen speichern und dann die Auswertung völlig getrennt durchführen.

Nachdem wir während 10 ms ein Spektrum aufgenommen haben, steht uns damit eine Zeit von weiteren 10ms für die Auswertung zur Verfügung.

Wir haben gefunden, daß es am günstigsten ist, die

Produkte (6.3) über die Logarithmen der Faktoren zu bilden, da die Multiplikation bei den digitalen Rechnern selbst bei festverdrahteter Multiplikation relativ zeitraubend ist. Für die Konzentrationen x_ν erhalten wir mit Hilfe von Logarithmen den Ausdruck

$$x_\nu = \sum_{i=1}^{230} 10^{\{\lg y_i + \lg g_{i\nu}\}}, \quad \nu = 1 \text{ bis } N. \qquad (6.4)$$

Die Werte y_i werden mit Hilfe des direkten Datenkanals ("Data Break") ohne Benutzung des Rechenwerkes in den Speicher der PDP8 übernommen. Das Programm wird bei der Aufnahme eines Meßwertes lediglich während eines Kernspeicherzyklus unterbrochen. Die Steuerung der Aufnahme der Meßwerte geschieht ausschließlich durch das Rapidspektrophotometer. Die Steuersignale werden durch den 50Hz beziehungsweise den 12kHz Spiegel geliefert. Nachdem die Werte in den Speicher des Rechners übernommen worden sind, wird sofort mit der Auswertung begonnen.

Wir speichern nicht die Werte $g_{i\nu}$, sondern den Logarithmus dieser Werte. Um das Produkt $y_i g_{i\nu}$ mit Hilfe des Logarithmus zu bilden, benötigen wir außerdem die Werte $\log y_i$. Wir benutzen den Meßwert y_i als Adresse von Speicherzellen, in denen $\log y_i$ gespeichert ist. Auf diese Weise ist es möglich, sehr schnell die Werte zu logarithmieren. Wir addieren mit dem Rechner

$$\log y_i + \log g_{i\nu} = \log (y_i g_{i\nu}) \qquad (6.5)$$

und erhalten den Logarithmus des Produktes $y_i g_{i\nu}$. Den Numerus suchen wir ebenfalls mit Hilfe einer im Rechner gespeicherten Tabelle. Die Werte $g_{i\nu}$ können positiv und

negativ sein, während die Meßwerte y_i wegen ihrer physikalischen Bedeutung als Extinktionswerte sicher nicht negativ sind. Die Logarithmen der negativen g_{iv}-Werte sind komplexwertige Zahlen. Der Imaginärteil wird zusätzlich durch bestimmte Bit-Konfigurationen im vorderen Teil des Wortes dargestellt. (Einzelheiten siehe Beschreibung des Programmes 67-10-D10 im Anhang.) Beim Aufsuchen der Numeri wird eine andere Tabelle benutzt, in der negative Werte stehen. Auf diese Weise benötigt die Berücksichtigung des Vorzeichens der g_{iv}-Werte keinerlei zusätzliche Rechenzeit.

Die Meßwerte y_i übernehmen wir mit einer Genauigkeit von neun Bits in den Rechner. Die Meßwerte sind damit Zahlen zwischen 0 und 511. Bei der Analog-Digitalwandlung werden die Meßwerte stets zu ganzen Zahlen abgerundet. Die Meßwerte sind im Mittel um 0,5 Einheiten größer als die erhaltenen Werte. Wir erhöhen erst den Meßwert um 0,5 Einheiten und bestimmen dann den Logarithmus. Damit reduzieren wir die Rundungsfehler und umgehen die Situation, dem Wert Null einen Wert für den Logarithmus zuordnen zu müssen.

Wir schalten den Analog-Digitalwandler so, daß das höchstwertige Bit stets 1 gesetzt ist. Damit haben wir erreicht, daß unsere Meßwerte durch Werte von 2049-2560 charakterisiert werden. In diesen Speicherplätzen stehen die Logarithmen der Zahlen von 0,5 bis 511,5. Wir benutzen Logarithmen zur Basis $\sqrt[200]{10}$, die den 200-fachen Wert der dekadischen Logarithmen haben. Dadurch können wir uns auf ganzzahlige Logarithmen beschränken.

Wir erhalten für die Logarithmen Werte zwischen 0 und 542. Die Werte $g_{i\nu}$ normieren wir zum Beispiel so, daß ihre Logarithmen zur Basis $\sqrt[200]{10}$ Werte zwischen -542 und 0 annehmen. Das ist möglich; denn ein gemeinsamer Faktor bei den $g_{i\nu}$-Werten wirkt sich als Faktor bei den errechneten Konzentrationen aus. Die Angabe über die Normierung der $g_{i\nu}$-Werte soll nur als Beispiel angesehen werden; denn verschiedene Mehrkomponentensysteme erfordern eine verschiedene Normierung der Werte $g_{i\nu}$. Die Logarithmen der Produkte nehmen damit Werte von -542 bis 542 an. Durch Addition von 1384 erhielten wir Werte im Bereich von 822 bis 1906. Wir benutzen die Werte als Adressen für die entsprechenden Speicherplätze; denn in diesen Speicherplätzen stehen die Numeri der um 1384 verminderten Zahlen. Auf diese Weise können wir durch einen indirekten Additionsbefehl die Numeri aufsuchen und diese Numeri gleichzeitig aufsummieren.

Mit dem geschilderten Verfahren sind wir in der Lage, die Summenspektren während der zur Verfügung stehenden Zeit nach drei Komponenten auszuwerten. Der Anhang enthält das zugehörige Rechenmaschinenprogramm 67-10-D10 mit einer ausführlichen Beschreibung. Aus dieser Beschreibung lassen sich weitere Einzelheiten über das Verfahren, wie zum Beispiel die genaue Aufteilung des Kernspeichers und der zur Verfügung stehenden Zeit, entnehmen.

Die Funktionen $g_\nu(\lambda)$ sind keineswegs monotone Funktionen, dadurch kommt es vor, daß im Rahmen der Darstel-

lungsgenauigkeit $g_{i\nu}$-Werte für verschiedene i aber gleiche ν den gleichen Wert haben. Andererseits kommt es vor, daß auch $g_{i\nu}$-Werte für gleiche i aber verschiedene ν den gleichen Wert haben. Durch Beachtung dieser Tatsachen gelingt es, noch etwas Rechenzeit zu sparen.

Wir glauben, daß die Ausrechnung mit Hilfe der Logarithmentabellen die schnellste Methode zur Berechnung der Produktsummen mit dem zur Verfügung stehenden Rechner ist. Mit Hilfe der festverdrahteten Multiplikation des Rechners ist man nicht in der Lage, die Auswertung während der Messung auch nur nach einer Komponente durchzuführen.

6.111. Betrachtungen zur Genauigkeit des Verfahrens

Bei der Berechnung der Konzentrationen

$$x_\nu = \sum_{i=1}^{230} y_i \, g_{i\nu}, \quad \nu = 1..3, \qquad [6.3]$$

mit dem Programm 67-10-D10 gehen eine Reihe von Rundungsfehlern in das Ergebnis ein. Die Normierung der Werte $g_{i\nu}$ sollte so vorgenommen werden, daß die maximalen Werte der x_ν dem maximal möglichen Wert von 4095 möglichst nahe kommen. Dieser Wert setzt sich als Summe von 230 Produkten zusammen. Wie in Lit.85, I.Kapitel genau dargelegt ist, erhält man als Fehler f_z einer Summe

$$z = \sum_{i=1}^{n} \omega_i \qquad (6.6)$$

von n Näherungswerten ω_i den Ausdruck

$$|f_z| = \frac{\alpha}{\sqrt{3}} \sqrt{n} \quad . \qquad (6.7)$$

α ist der absolute Fehler der einzelnen Summanden; n ist die Zahl der Summanden. In 68% der Fälle kann man erwarten, daß das Ergebnis mit einem Fehler behaftet ist, der innerhalb der Grenzen $\pm f_z$ liegt. Innerhalb der Schranken $\pm 2f_z$ werden 95% der Ergebnisse liegen.

Der mögliche absolute Fehler α der einzelnen Produkte richtet sich sehr nach den Werten, die in den Spektren vorkommen. Er schwankt zwischen den Zahlenwerten von 0,5 bis 6. Er ist im wesentlichen durch die Rundungsfehler beim Nachschlagen der im Rechner gespeicherten Tabellen bedingt. Der Wert 6 für den absoluten Fehler ist dann möglich, wenn ein Signal mit maximaler Amplitude gemessen wird und mit maximalem Faktor g_{iy} in die Produktsumme eingeht. Das Produkt beträgt dann maximal 511. Das kann nur selten vorkommen; denn wir berechnen eine Summe, die einen Wert bis zu 4095 annehmen kann und aus 230 Summanden besteht. Wir sind bestrebt, Auswertverfahren zu benutzen, die nur kleine negative Summanden enthalten (siehe 4.Kapitel). Daher wird man annehmen können, daß die meisten der Summanden unter 100 liegen.

Zur Abschätzung nehmen wir einen Wert für den Fehler $\alpha = 2$ an. Dann ergibt sich aus (6.7) der Wert

$$|f_z| = \frac{2}{\sqrt{3}} \sqrt{230}, \qquad (6.8)$$

beziehungsweise

$$|f_z| \approx 17 \, . \qquad (6.9)$$

Wir können annehmen, daß unsere Ergebnisse in 68% der Fälle mit Rundungsfehlern von weniger als ± 17 behaftet sind. Bei dem größten möglichen Wert des Ergebnisses von 4095 ist ± 17 weniger als $\pm 0{,}24\%$.

Für die Mehrkomponentensysteme, für die wir die Werte ε_{iv} kennen, wie zum Beispiel für die Nucleosid- und Nucleotidgemische (siehe 4.Kapitel), ist $\alpha = 2$ eher zu groß als zu klein veranschlagt, so daß der Wert von $\pm 0{,}24\%$ dadurch sicher eine obere Grenze für den auftretenden Fehler darstellt.

6.12. Die Auswertung mit einem Rechner von 16-18 Bit Wortlänge[1]

Es soll hier beschrieben werden, welches neue Verfahren ein etwas größerer Rechner bei der Bildung der Produktsumme (6.3) möglich macht. Wir erörtern die Möglichkeiten an Hand der PDP9 der nächst größeren Rechenmaschine der Firma Digital Equipment. Die entsprechenden Rechner anderer Fabrikate bieten ähnliche Möglichkeiten.

Die elektronische Rechenmaschine PDP9 hat ein 18 Bit Wort und eine Zykluszeit von $1\,\mu s$.

Wir sind in der Lage, bis zu acht Komponenten mit dieser Maschine simultan auszuwerten, wenn der Kernspeicher auf 16 K erweitert wird. Das ist nicht nur wegen der kürzeren Zykluszeit möglich, sondern der wesentliche Grund ist, daß jedes Wort eines 8 K Kernspeichers direkt

[1] Prof.Dr.Lübbers wird als neuer Direktor des Max Planck-Institutes für Arbeitsphysiologie in Dortmund die Experimente mit einem neuen Modell des Rapidspektrophotometers und einem etwas größeren und schnelleren Rechner weiterführen.

adressierbar ist. Das Auswertverfahren wird linear programmiert, es werden keine Schleifen benutzt.

Der erste wesentliche Befehl des Programmes lautet TAD I YI (benötigt 3μs) .

Dadurch wird der Logarithmus des Wertes YI in den Akkumulator geholt. Im nächsten Rechenschritt wird der Logarithmus des entsprechenden GI1 Wertes dazuaddiert

TAD LOG (GI1), (benötigt 2μs) .

Dann wird dieser Wert weggespeichert, aber der Wert bleibt auch im Akkumulator,(diesen Befehl gibt es bei der PDP8 nicht). Der Befehl heißt

DAC SPI1 , (benötigt 2μs) .

Addieren wir jetzt den Logarithmus von GI2/GI1 dazu

TAD LOG(GI2/GI1), (benötigt 2μs),

so haben wir bereits den Logarithmus des Produktes YI * GI2 im Akkumulator stehen. Entsprechend wird weiter verfahren.

Da keine Schleifen und Zähler benutzt werden, müssen die Befehle 8 * 230 mal wiederholt werden. Erst wenn alle 8 mal 230 Produkte auf diese Weise berechnet wurden, werden von den Produkten, die zu einer Komponente gehören, die Numeri nachgeschlagen und die Produkte werden gleichzeitig aufsummiert. Das geschieht durch Befehle der Form

TAD I LOG(Y1 * G11), (benötigt 3μs),
TAD I LOG(Y2 * G21),
TAD I LOG(Y3 * G31),
.
.
.

Die Aufsummierung erfolgt ebenfalls, um Zeit zu spa-

ren, ohne Programmschleifen.

Wir benötigen für die erste Komponente pro Meßwert 11 μs, darin ist die eine μs für die Übernahme der Meßwerte mit dem direkten Datenkanal bereits enthalten. Für jede weitere Komponente benötigen wir 7 μ s pro Meßwert im Hauptteil des Programmes. Da keine Schleifen benutzt werden, brauchen wir relativ viel Kernspeicherplatz. Es ist daher bei mehr als vier Komponenten eine Erweiterung des Kernspeichers auf 16 K nötig. Zur Programmsteuerung und Ausgabe der Werte benötigen wir noch etwa 200 μs. Diese Zeit wird nur für jedes volle Spektrum einmal benötigt, auf den einzelnen Meßwert umgerechnet benötigen wir also knapp eine Mikrosekunde. Für die erste Komponente benötigen wir 11 μs, für 7 weitere Komponenten 7 * 7μs= 49 μs. Rechnet man diese Zeiten zusammen, so erhält man 61 μs.

Von den 88 μs, die zur Verfügung stehen, werden nur 61 μ s zur Analyse des 8 Komponentensystems benötigt.

5.2. Die Auswertung der Summenspektren mit Analog- und Hybridrechnern

Wir sind bemüht, für die Summenspektren des Rapidspektrophotometers Auswertmethoden zu benutzen, bei denen die Auswertung während der Messung erfolgen kann.

Wir haben die Möglichkeit in Betracht gezogen, die Auswertung mit Hilfe eines Analogrechners vorzunehmen. Die ersten Auswertverfahren für das Rapidspektrophotometer wurden von Lübbers und Niesel mit Hilfe selbstgefertigter Analogbauelemente vorgenommen. Die Auswertung mit Analogrechnern bietet sich insofern an, als im Rapidspektrophotometer bereits der erste Teil der Auswertung, nämlich die Logarithmierung und die daran anschließende Differenzbildung, auf analoge Weise erfolgt.

In diesem Abschnitt beschränken wir uns wieder auf rein multiplikative Farbmischungen. Das bedeutet, die gemessenen Spektren $y(\lambda)$ ergeben sich als eine Linearkombination aus den Grundkomponenten $\varphi_\nu(\lambda)$

$$y(\lambda) = \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) \; . \qquad [4.4]$$

Aus der im 4.Kapitel dargestellten Theorie wissen wir, daß die Konzentrationen x_ν sich dann als Skalarprodukte

$$x_\nu = (y, h_\nu), \quad \nu = 1 \text{ bis } N, \qquad [4.88]$$

darstellen lassen. Erfolgt die Messung der Spektren, indem man M Extinktionswerte y_i mißt, so erhält man für die Konzentrationen

$$x_\nu = \sum_{i=1}^{M} y_i \, g_{i\nu} \; , \quad \nu = 1 \text{ bis } N . \qquad [6.3]$$

Die Schwierigkeit bei der Berechnung dieser Produktsummen mit Hilfe eines Analogrechners liegt in den Frequenzbeschränkungen der Multiplizierereinheiten und vor allem in der Ungenauigkeit der Funktionsgeneratoren. Erst in der allerletzten Zeit ist die Entwicklung der Multiplizierer in einigen Analogrechnern so weit gediehen, daß eine Meßwertfolge von 24 000 beziehungsweise 50 000 je Sekunde nicht untragbare Fehler nach sich zieht.

Die Hauptschwierigkeit, die bei den Analogrechnern auftritt, liegt in den Funktionsgeneratoren. Der Wert einer Funktion kann nur an 10-50 Punkten festgelegt werden. Die Zwischenpunkte werden durch Interpolation erzeugt. Diese Interpolation der Funktionen $g_{i\nu}$ verursacht bei der Berechnung der Konzentrationen

$$x_\nu = \sum_{i=1}^{M} y_i \, g_{i\nu} \quad \text{für} \quad \nu = 1 \text{ bis } N \qquad [6.3]$$

untragbare Fehler. Darum haben wir uns für die Auswertung mit Analogrechengeräten das Auswertverfahren variiert. Wir erprobten das im folgenden beschriebene Verfahren mit dem Hybridrechner E A I 640/680.

Das Auswertverfahren, welches wir konstruiert haben, basiert auf der Orthogonalitätsmethode. Die Grundgedanken der Orthogonalitätsmethode haben wir am Anfang des vierten Kapitels beschrieben. Man wählt N linear unabhängige Funktionen $\hat{\psi}_\nu(\lambda)$. Aus den Bedingungen, daß die

Funktion

$$v(\lambda) = y(\lambda) - \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) \qquad [4.15]$$

orthogonal zu N Funktionen $\hat{\psi}_\mu(\lambda)$ ist, erhält man N Gleichungen. Es handelt sich dabei um ein lineares Gleichungssystem N-ter Ordnung für die N Größen x_ν. Wie im vierten Kapitel gezeigt wurde, unterscheiden sich verschiedene Auswertverfahren durch verschiedene Funktionensysteme $\hat{\psi}_\mu(\lambda)$. Das Verfahren, welches die kleinsten Fehler für die Konzentrationen x_ν erwarten läßt, ergibt sich, wenn man

$$\hat{\psi}_\mu(\lambda) = h_\mu(\lambda) \qquad (6.10)$$

setzt. Wie man die Funktionen $h_\mu(\lambda)$ errechnen kann, wurde genau beschrieben. Da $h_\mu(\lambda)$ orthogonal zu allen $\varphi_\nu(\lambda)$ mit $\nu \neq \mu$ ist und

$$(h_\mu, \varphi_\mu) = 1 , \qquad (6.11)$$

so folgt aus den Bedingungsgleichungen der Orthogonalitätsmethode

$$x_\nu = (y, h_\nu), \qquad \nu = 1 \text{ bis } N . \qquad [4.88]$$

Die Lösung eines linearen Gleichungssystemes erübrigt sich. Wir sind mit einem Analogrechner nicht in der Lage, die Funktionen $h_\mu(\lambda)$ genügend genau zu erzeugen. Wir bilden Funktionen $h_\mu^*(\lambda)$, die den Funktionen $h_\mu(\lambda)$ möglichst ähnlich sein sollen. Diese $h_\mu^*(\lambda)$ benutzen wir als Ausgangsfunktionen für die Orthogonalitätsmethode. Aus

$$(v, h_\mu^*) = 0 , \quad \mu = 1 \text{ bis } N , \qquad (6.12)$$

folgt

$$\sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \, (h_\mu^*, \varphi_\nu) = (h_\mu^*, y), \quad \mu = 1 \text{ bis } N. \tag{6.13}$$

Als A bezeichnen wir die Matrix mit den Elementen

$$A_{\mu\nu} = (h_\mu^*, \varphi_\nu). \tag{6.14}$$

Mit den Abkürzungen

$$\underline{x} = \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ x_N \end{pmatrix} \tag{6.15}$$

und

$$(\underline{h^*, y}) = \begin{pmatrix} (h_1^*, y) \\ (h_2^*, y) \\ \cdot \\ (h_N^*, y) \end{pmatrix} \tag{6.16}$$

erhalten wir für das Gleichungssystem (6.13) den Ausdruck

$$A \, \underline{x} = (\underline{h^*, y}). \tag{6.17}$$

Die Diagonalelemente von A werden wesentlich größer sein als die Nichtdiagonalelemente. Das folgt daraus, daß die Funktionen $h_\mu^*(\lambda)$ bis auf die Ungenauigkeiten der Funktionsgeneratoren mit den Funktionen $h_\mu(\lambda)$ übereinstimmen. Im Idealfall, daß

$$h_\mu^*(\lambda) = h(\lambda) \quad \text{für } \mu = 1 \text{ bis } N \tag{6.18}$$

gilt, ergibt sich für A die Einheitsmatrix.

Aus (6.17) erhält man für die Konzentrationen

$$\underline{x} = A^{-1}(h^*, y) . \qquad (6.19)$$

Die Matrix A^{-1} mit den Elementen $(A^{-1})_{ik}$ ist die inverse Matrix zu A. Dieser Ausdruck (6.19) bildet die Grundlage der Auswertung mit Analogrechnern. Mit den gemessenen Summenspektren müssen die N Skalarprodukte

$$(h_\mu^*, y)$$

gebildet werden. N verschiedene Linearkombinationen dieser Produkte ergeben die gesuchten Konzentrationen. Diese Linearkombinationen können im Analogrechner durch N^2 Potentiometer gebildet werden. Vor Beginn des Versuches bestimmen wir die Elemente

$$A_{\mu\nu} = (h_\mu^*, \varphi_\nu) \qquad [6.14]$$

der Matrix A. Um diese Elemente zu bekommen, setzt man $y(\lambda) = \varphi_\nu(\lambda)$. Das ist am einfachsten dadurch zu machen, daß man die reinen Grundsubstanzen photometriert. Die Matrix A ist bei mehr als drei oder vier Komponenten gegebenenfalls mit einer digitalen Rechenmaschine zu invertieren.

Die wesentliche Rechenschaltung besteht darin, die Skalarprodukte (h_μ^*, y) zu bilden. Für die Berechnung der inneren Produkte (h_μ^*, y) benötigen wir N analoge Multiplizierer mit jeweils einem nachgeschalteten Integrierer. Die Faktoren, die auf die Multiplizierer gegeben werden, sind einmal das Summenspektrum $y(\lambda)$ und zum anderen die Funktionen $h_\mu^*(\lambda)$. Diese Funktionen $h_\mu^*(\lambda)$ sollten den Funktionen $h_\mu(\lambda)$ möglichst ähnlich sein.

Auswertversuche von simulierten Summenspektren mit dem hybriden Rechner E A I 640/680

Um die Möglichkeiten zu erproben, die für die Auswertung von Summenspektren mit einem analogen beziehungsweise hybriden Rechner bestehen, haben wir die folgenden Untersuchungen angestellt. Mit dem hybriden Rechner E A I 640/680 der Firma E A I haben wir ein Summenspektrum aus zwei Komponenten simuliert.

$$y(t) = x_1 \varphi_1(t) + x_2 \varphi_2(t) . \qquad (6.20)$$

Die Anteile x_1 und x_2 der beiden Komponenten am Summenspektrum $y(t)$ können durch Potentiometer geändert werden. Die zweite Komponente $\varphi_2(t)$ enthält unter anderem etwa die zehnfachen Frequenzen der ersten Komponente $\varphi_1(t)$. Das wurde gemacht, um die Frequenzabhängigkeit zu untersuchen.

Mit analogen Multiplizierern und nachgeschalteten Integrierern werden die Skalarprodukte

$$(h_1^*, y) \quad \text{und} \quad (h_2^*, y)$$

gebildet. $h_1^*(t)$ und $h_2^*(t)$ sind grobe Nachbildungen der Funktionen $h_1(t)$ und $h_2(t)$. $h_1^*(t)$ und $h_2^*(t)$ enthalten fünf mal weniger Stützpunkte als $h_1(t)$ und $h_2(t)$. $h_1^*(t)$ und $h_2^*(t)$ werden mit dem digitalen Teil des hybriden Rechners erzeugt.

Die Berechnung von x_1 und x_2 erfolgt nach den oben beschriebenen Verfahren durch Auflösung des Gleichungssystems

$$\begin{pmatrix} (h_1^*, \varphi_1) & (h_1^*, \varphi_2) \\ (h_2^*, \varphi_1) & (h_2^*, \varphi_2) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} (h_1^*, y) \\ (h_2^*, y) \end{pmatrix}. \tag{6.21}$$

Die Lösung lautet

$$\begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \end{pmatrix} = \frac{1}{D} \begin{pmatrix} (h_2^*, \varphi_2) & -(h_1^*, \varphi_2) \\ -(h_2^*, \varphi_1) & (h_1^*, \varphi_1) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} (h_1^*, y) \\ (h_2^*, y) \end{pmatrix} \tag{6.22}$$

mit

$$D = (h_1^*, \varphi_1)(h_2^*, \varphi_2) - (h_1^*, \varphi_2)(h_2^*, \varphi_1). \tag{6.23}$$

Um die Größe x_1 zu bekommen, schwächen wir (h_1^*, y) durch ein Potentiometer A und (h_2^*, y) durch ein Potentiometer B. Die so geschwächten Signale geben wir auf einen Summierer. Die Einstellung der Potentiometer A und B genügt der Relation

$$\frac{B}{A} = \frac{-(h_1^*, \varphi_2)}{(h_2^*, \varphi_2)}. \tag{6.24}$$

Der Ausgang des Summierers liefert uns die Größe x_1^*. Der Stern * deutet darauf hin, daß x_1 und x_1^* sich einmal durch einen konstanten Faktor und zum anderen durch den Verfahrensfehler unterscheiden.

Entsprechend verfahren wir bei dem Wert x_2. Wir schwächen (h_1^*, y) durch ein Potentiometer C und (h_2^*, y) durch ein Potentiometer G. Die so geschwächten Signale geben wir auf einen Summierer. Die Einstellung der Potentiometer C und G genügt der Relation

$$\frac{C}{G} = \frac{-(h_2^*, \varphi_1)}{(h_1^*, \varphi_1)}. \tag{6.25}$$

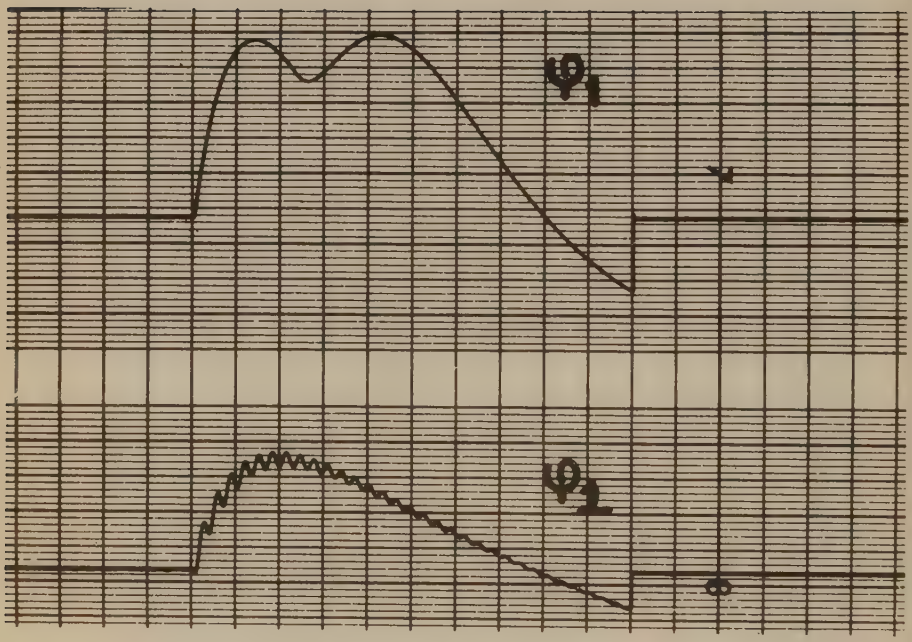


Abb.6.1. Die Grundkomponenten $\varphi_1(t)$ und $\varphi_2(t)$ für die mit einem hybriden Rechner simulierten Summenspektren.

Wir haben nun die folgenden Versuche durchgeführt.

Der erste Versuch sollte klären, ob es mit analogen Multiplizierern möglich ist, die 100 Spektren, die mit dem Rapidspektrophotometer anfallen, zu analysieren.

Bei gleichem Mischungsverhältnis der beiden Komponenten betrachten wir den Quotienten der errechneten Werte x_1^* und x_2^* in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit, mit der wir den Vorgang ablaufen lassen. Wir bilden den Quotienten

$$\frac{x_1^*}{x_2^*} = z(f). \qquad (6.26)$$

f ist die Zahl ausgewerteter Summenspektren pro Sekunde.

Da die zweite Komponente unter anderem die zehnfachen Frequenzen der ersten Komponente enthält, wird bei einem frequenzabhängigen Fehler der Multiplizierer die erste Komponente anders verzerren als die zweite Komponente. Das muß sich im Verhalten der Funktion z(f) wiederspiegeln.

Wir fanden bei bis zu 100 Spektren pro Sekunde keine Änderung des Wertes z(f).

Auf der Abbildung 6.1 sind die für diesen Versuch benutzten Grundkomponenten $\varphi_1(t)$ und $\varphi_2(t)$ wiedergegeben. Die Abbildung 6.2 zeigt die benutzte Summenfunktion. Diese Funktion wurde zwischen ein und hundert mal in der Sekunde nach ihren Komponenten analysiert. Im Rahmen der Meßgenauigkeit erhielten wir in jedem Fall das gleiche Resultat.

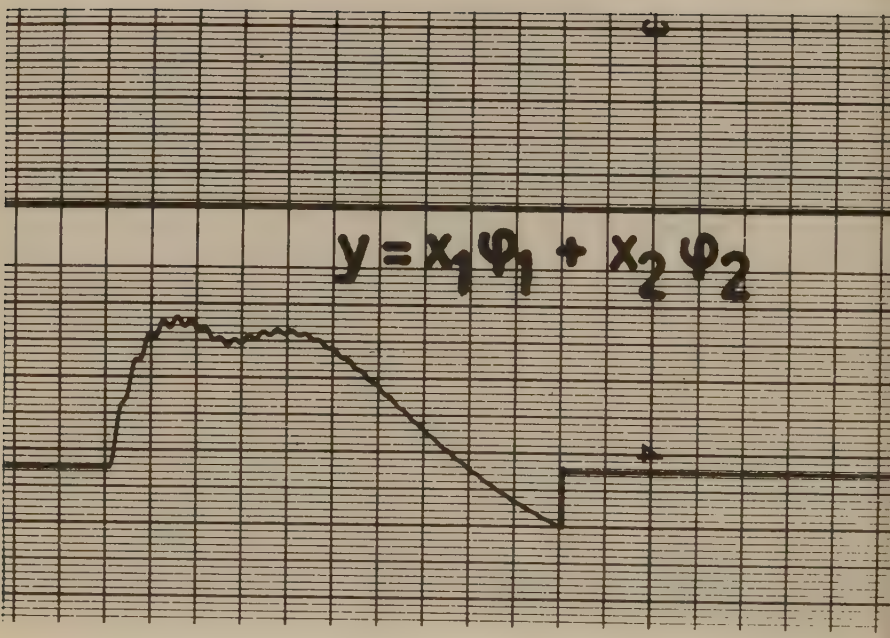


Abb.6.2. Ein mit einem hybriden Rechner simuliertes Summenspektrum $y(t) = x_1 \varphi_1(t) + x_2 \varphi_2(t)$.

Der zweite Versuch diente dazu festzustellen, inwieweit man die hineingesteckten Konzentrationen mit der beschriebenen Methode wiederfinden kann. Als Grundkomponenten wurden die Funktionen $\varphi_1(t)$ und $\varphi_2(t)$ benutzt, wie sie auf der Abbildung 6.1 wiedergegeben sind. Es wurde allerdings ein $\varphi_2(t)$ benutzt, welches nicht die als kleine Zacken sichtbaren höherfrequenten Anteile enthält. $\varphi_2(t)$ war in diesem Falle eine Funktion mit einem Maximum.

Auf der Abbildung 6.3 sind die Ergebnisse dieses Versuches wiedergegeben. Es handelt sich um eine Photographie der mit einem Schreiber geschriebenen Resultate. Die unabhängige Variable der x-Achse ist die Zeit. Der Wert x_1 wurde konstant gehalten, während der Wert x_2 variiert wurde. Das erwartete Resultat besteht darin, daß sich der Wert x_2^* entsprechend dem Werte x_2 ändert, während x_1^* in guter Annäherung konstant ist.

Entsprechende Resultate erhielten wir, wenn wir x_1 änderten und x_2 konstant hielten. Diese Versuche wurden wiederholt mit einer Funktion $\varphi_2(t)$, die genau der auf der Abbildung 6.1 wiedergegebenen entsprach. Wir erhielten ganz entsprechende Resultate.

Diese Versuche mit dem Rechner E A T 640/680 zeigten, daß es außer mit digitalen Rechenmaschinen auch mit analogen oder zumindestens hybriden Rechnern möglich ist, die Spektren des Rapidspektrophotometers zu analysieren. Bei einem hybriden Rechner wird man den digitalen Teil zum Steuern und als Funktionsgeneratoren benutzen, während man die Produktsummen analog bilden wird.

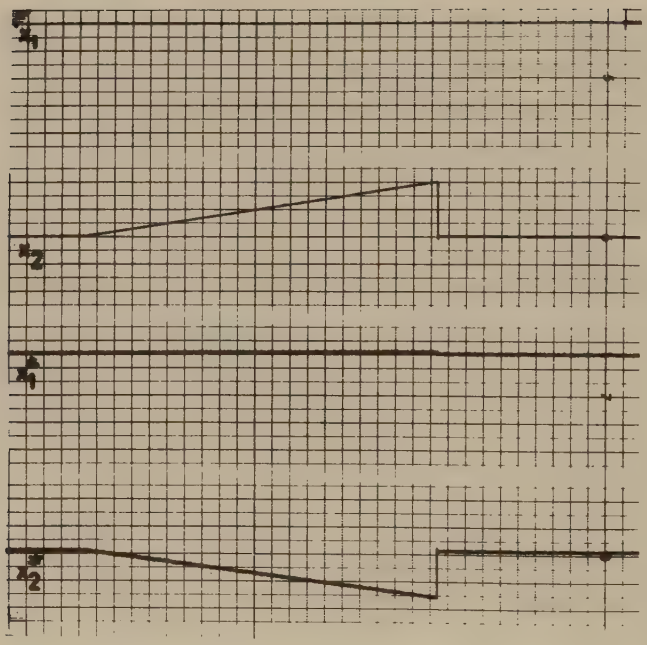


Abb.6.3. Ergebnisse der Mehrkomponentenanalyse mit einem hybriden Rechner.
x_1 und x_2 sind die in die simulierten Summenspektren hineingesteckten Konzentrationen. x_1^* und x_2^* sind die durch die anschließende Analyse errechneten Werte.

7.Kapitel

Die Auswertung spezieller Mehrkomponentensysteme bei einer Kombination von additiver und multiplikativer Farbmischung

Wir betrachten das Meerschweinchengehirn der Abbildung 1.2. Will man zum Beispiel den Redoxzustand des Hämoglobins in den Blutgefäßen photometrisch ermitteln, so muß man berücksichtigen, daß das Hämoglobin nicht gleichmäßig über die Probe verteilt ist. Der Farbstoff ist kompartimentiert. Das Hämoglobin befindet sich in den Blutgefäßen, während das übrige Gewebe frei von Hämoglobin ist. Wir sprechen von einem "Weißanteil" und meinen den Teil der photometrierten Fläche, der frei von Farbstoff ist.

Es handelt sich um eine Kombination von multiplikativer und additiver Farbmischung. Im ersten Teil dieses Kapitels werden relativ allgemein gehaltene Beziehungen für derartige Farbmischungen hergeleitet. Im zweiten Teil wird bei speziellen Systemen die Analyse nach den Komponenten und ihrer Verteilung durchgeführt. Dabei ist ein wesentlicher Gesichtspunkt nachzuweisen, daß bereits eine geringe inhomogene Verteilung im Meßfeld einen Effekt verursacht, der nicht vernachlässigt werden darf.

Um eine Kombination von additiver und multiplikativer Farbmischung zu beschreiben, betrachten wir als

erstes eine Küvette mit einer klaren Lösung von Farbstoffen. Es handelt sich dabei um eine reine multiplikative Farbmischung. Dafür gilt die Beziehung

$$L(\lambda) = L_o(\lambda) \prod_{\nu=1}^{N} f_\nu(\lambda)^{x_\nu D} . \qquad (7.1)$$

$L_o(\lambda)$ beschreibt die Intensität für das einfallende Licht. $L(\lambda)$ dagegen steht für die Intensität des aus der Küvette austretenden Lichtes. D ist die Dicke der Küvette, und die Funktionen $f_\nu(\lambda)$ beschreiben die einzelnen Farbstoffkomponenten, die in der Konzentration x_ν vorliegen. Wir benutzten diese Beziehung in den vorhergehenden Kapiteln in der logarithmierten Form

$$\lg \frac{L_o(\lambda)}{L(\lambda)} = \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu (-1)\, D \lg f_\nu(\lambda) . \qquad (7.2)$$

Mit

$$y = \lg \frac{L_o(\lambda)}{L(\lambda)} \qquad (7.3)$$

und

$$\varphi_\nu(\lambda) = (-1)\, D \lg f_\nu(\lambda) \qquad (7.4)$$

ergibt sich

$$y(\lambda) = \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) . \qquad [4.4]$$

Stellt man mehrere entsprechend kleinere Küvetten nebeneinander in den Strahlengang eines Photometers, so folgt aus (7.1) die Beziehung

$$L(\lambda) = L_o(\lambda) \sum_{i=1}^{M} w_i \prod_{\nu=1}^{N} f_\nu(\lambda)^{x_{\nu i} D_i} . \qquad (7.5)$$

Die Gewichte w_i beschreiben den Anteil der i-ten Küvette an dem Teil der photometrierten Fläche. Diese i-te Küvette hat die Dichte D_i und enthält von dem ν-ten Farbstoff die Konzentration $x_{\nu i}$. Bei einem kontinuierlich sich ändernden Objekt erhält man als Verallgemeinerung

$$L(\lambda) = \frac{L_o(\lambda)}{F} \iint_F \left(\prod_{\nu=1}^{N} f_\nu(\lambda)^{\int_o^{D(y,z)} x_\nu(s,y,z)ds} \right) dydz. \quad (7.6)$$

Die photometrierte Fläche F wird durch die Koordinaten y und z beschrieben. Die Koordinate senkrecht zur Fläche F in Richtung des Lichtstrahles ist s. Das Objekt hat bei y und z die Stärke D(y,z).

Das Ziel der Messung ist, möglichst viel über die Funktion x(s,y,z) zu erfahren. Aus dem Ausdruck (7.6) läßt sich entnehmen, daß man durch die Messung der Funktion $L(\lambda)$ nichts über die Abhängigkeit von der Größe s aussagen kann. Denn es geht nur das Integral

$$q_\nu(y,z) = \int_o^{D(y,z)} x_\nu(s,y,z)\, ds \quad (7.7)$$

in die Berechnung (7.6) für $L(\lambda)$ ein. $q_\nu(y,z)$ ist eine Funktion der Punkte der Fläche F. Wir definieren eine Funktion $w_\nu(q_\nu)$ dadurch, daß

$$\int_{q_{\nu 1}}^{q_{\nu 2}} w_\nu(q_\nu)\, dq_\nu \quad (7.8)$$

den Anteil der Fläche F ergibt, für den ein Wert von q_ν zwischen $q_{\nu 1}$ und $q_{\nu 2}$ zutrifft. $w_\nu(q_\nu)$ ist die "Anteilsdichte" der Fläche F für den Wert q_ν. Die Normierung

von $w_\nu(q_\nu)$ ist so gewählt, daß

$$\int_0^\infty w_\nu(q_\nu)\,dq_\nu = 1 . \qquad (7.9)$$

Entsprechend definieren wir eine Funktion $w(q_1,q_2,..q_N)$. Der Ausdruck

$$\int_{q_{11}}^{q_{12}} \int_{q_{21}}^{q_{22}} .. \int_{q_{N1}}^{q_{N2}} w(q_1,q_2,..q_N)dq_1 .. dq_N \qquad (7.10)$$

ergibt den Anteil der Fläche F, für den q_1 zwischen q_{11} und q_{12}, q_2 zwischen q_{21} und q_{22} . . . u.s.w. liegt. $w(q_1,...q_N)$ ist die "Anteilsdichte" der Fläche F für die Werte q_1, q_2, . . q_N. Die Funktion $w(q_1,...q_N)$ ist wie folgt normiert

$$\int_0^\infty . . . \int_0^\infty w(q_1,...q_N)\,dq_1...dq_N = 1. \qquad (7.11)$$

Wir nehmen eine Transformation des Integrals (7.6) von dem y,z-Raum in den Raum der q_ν vor

$$L(\lambda) = L_o(\lambda) \int_0^\infty \int_0^\infty .. \int_0^\infty (w(q_1...q_N) \prod_{\nu=1}^{N} f_\nu(\lambda)^{q_\nu})dq_1dq_2..dq_N . \qquad (7.12)$$

Die Werte q_ν haben, wie man aus (7.7) ersieht die physikalische Bedeutung von in der Probe zurückgelegtem Weg multipliziert mit der ν-ten Konzentration auf dem entsprechenden Wegstück. In der Formel (7.12) sind die Werte q_ν nicht mehr gewissen Punkten der photometrierten Fläche zugeordnet. Damit hat die Formel (7.12) allgemeinere Bedeutung. Wie der Wert q_ν zustande kommt, ist gleich, er kann zum Beispiel in einer trüben Substanz auf einem Zickzackweg entstehen. Das Licht,

welches in den Empfänger fällt, kann an der Probe reflektiertes Licht sein. Die Formel (7.12) erweist sich als eine Verallgemeinerung des Ausdruckes (3.123), der als Grundlage der im dritten Kapitel beschriebenen Experimente über die Reflexionsphotometrie diente. Wir führen in (7.12) die Funktion

$$\varphi_\nu^*(\lambda) = - \lg f_\nu(\lambda) \tag{7.13}$$

ein und erhalten

$$L(\lambda) = L_o(\lambda) \int_0^\infty \int_0^\infty \dots \int_0^\infty w(q_1 .. q_N)\, 10^{-\sum_{\nu=1}^{N} q_\nu \varphi_\nu^*(\lambda)}\, dq_1 .. dq_N \tag{7.14}$$

Liegt nur eine Komponente im Gemisch vor, so entspricht diese Gleichung dem Ausdruck (3.123).

7.1. Untersuchungen an Objekten aus zwei Kompartimenten

Wir gehen von der Beziehung (7.5) aus und wählen $M = 2$ und benutzen (7.4).

Wir erhalten

$$L(\lambda) = L_o(\lambda) \left(w_1 10^{-\sum_{\nu=1}^{N} x_{\nu 1} \varphi_\nu(\lambda)} + w_2 10^{-\sum_{\nu=1}^{N} x_{\nu 2} \varphi_\nu(\lambda)} \right) \tag{7.15}$$

Wir führen

$$E_G = \lg \frac{L_o(\lambda)}{L(\lambda)} , \tag{7.16}$$

$$E_1 = \sum_{\nu=1}^{N} x_{\nu 1} \varphi_\nu(\lambda) \tag{7.17}$$

und

$$E_2 = \sum_{\nu=1}^{N} x_{\nu 2} \varphi_\nu(\lambda) \qquad (7.18)$$

ein. E_G ist die mit der Gesamtprobe gemessene Extinktion. Wir erhalten aus (7.15) die Beziehung

$$E_G(\lambda) = -\lg\,(w_1 10^{-E_1(\lambda)} + w_2 10^{-E_2(\lambda)}). \qquad (7.19)$$

Mit dem Programm 67-11-D13 können aus den gemessenen Werten $E_G(\lambda)$ die Werte für w_1 und w_2 und die Konzentrationswerte x_ν errechnet werden. Dabei ist angenommen, daß $E_1(\lambda)$=const ist und daß es sich bei $E_2(\lambda)$ um ein Ein- bis Vierkomponentengemisch handelt

$$E_2(\lambda) = \sum_{\nu=1}^{4} x_\nu \varphi_\nu(\lambda). \qquad (7.20)$$

Es werden die Werte $\hat{w}_1 = w_1 10^{-\text{const}}$ und w_2 erst einmal als bekannt vorausgesetzt. Damit werden die Werte x_ν ausgerechnet. Es wird gefordert, daß

$$\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} v^2(\lambda)\,d\lambda = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \left(E_G(\lambda) - \lg(\hat{w}_1 + w_2 10^{-\sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda)}) \right)^2 \qquad (7.21)$$

ein Minimum wird. Dies entspricht der Methode der kleinsten Quadrate von Gauß. Die gemessene und berechnete Kurve soll im quadratischen Mittel möglichst gut übereinstimmen. Die Bedingung

$$\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} v^2(\lambda)\,d\lambda = \text{Min} \qquad (7.22)$$

liefert ein lineares Gleichungssystem N-Ordnung für die N Unbekannten x_ν. Das Gleichungssystem folgt aus

den notwendigen Bedingungen

$$\frac{\partial}{\partial x_\nu} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \left(E_G(\lambda) - \lg(\hat{w}_1 + w_2 10^{-\sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda)}) \right)^2 = 0, \qquad \nu = 1 \ldots N \tag{7.23}$$

für einen Extremwert. Die Werte x_ν sind Funktionen der Größen $\hat{w}_1$ und w_2

$$x_\nu = U_\nu(\hat{w}_1, w_2), \quad \nu = 1 \ldots N \tag{7.24}$$

Damit läßt sich v als eine Funktion von $\hat{w}_1$, w_2 darstellen

$$v = V(\lambda, \hat{w}_1, w_2). \tag{7.25}$$

Wir bilden nach (7.22)

$$M(\hat{w}_1, w_2) = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} V^2(\lambda, \hat{w}_1, w_2)\, d\lambda. \tag{7.26}$$

Diese Funktion $M(\hat{w}_1, w_2)$ wird berechnet. Es werden die Werte $\hat{w}_1$, w_2 gesucht, für die M ein Minimum annimmt. Am einfachsten erwies es sich, die möglichen Werte zwischen 0 und 1,0 in Schritten von 0,01 abzusuchen, was die Benutzung einer digitalen Rechenmaschine voraussetzt. Mit den gefundenen Werten für $\hat{w}_1$ und w_2 liefert (7.24) die Konzentration x_ν.

Im folgenden soll diese Gleichung (7.19) für den Spezialfall $E_1(\lambda) \equiv 0$ genauer untersucht werden. Die Gewichtsfunktionen w_i beschreiben die Anteile an der photometrierten Fläche. Auf Grund dieser Definition ergibt sich

die folgende Normierung

$$\sum_{i=1}^{M} w_i = 1 \,. \tag{7.27}$$

Für M=2 erhalten wir

$$w_1 + w_2 = 1 \tag{7.28}$$

oder

$$w_2 = 1 - w_1 \,. \tag{7.29}$$

Wir nennen

$$w_1 = w \,. \tag{7.30}$$

Mit $E_1(\lambda) \equiv 0$ und (7.29), (7.30) ergibt sich

$$E_G(\lambda) = - \lg \left(w + (1-w)\, 10^{-E_W(\lambda)} \right) . \tag{7.31}$$

Der Teil w des Lichtes wird auf seinem Weg durch die Probe nicht moduliert. Wir nennen ihn deshalb den Weißanteil.

Auf der Abbildung 7.1 sind die Gesetzmäßigkeiten der Beziehung (7.31) aufgezeichnet. Auf den ausgezogenen Kurven ist w jeweils konstant, der Wert von w steht am Ende der Kurve. Die Kurven geben den Zusammenhang zwischen E_W und E_G an. Die Bedeutung der gestrichelten Kurven wird später erläutert.

Durch die Abbildung 7.1 bekommt man eine Übersicht, in welchem Maße die gemessene Extinktion E_G gegenüber der "wahren" Extinktion E_W vermindert ist, wenn der Anteil w an unmoduliertem Licht beigemischt wird.

Kennen wir den Weißanteil, z.B. w=0,2, und messen E_G=0,58 O.E., so entnehmen wir dem Diagramm, daß E_W=1,10 O.E.

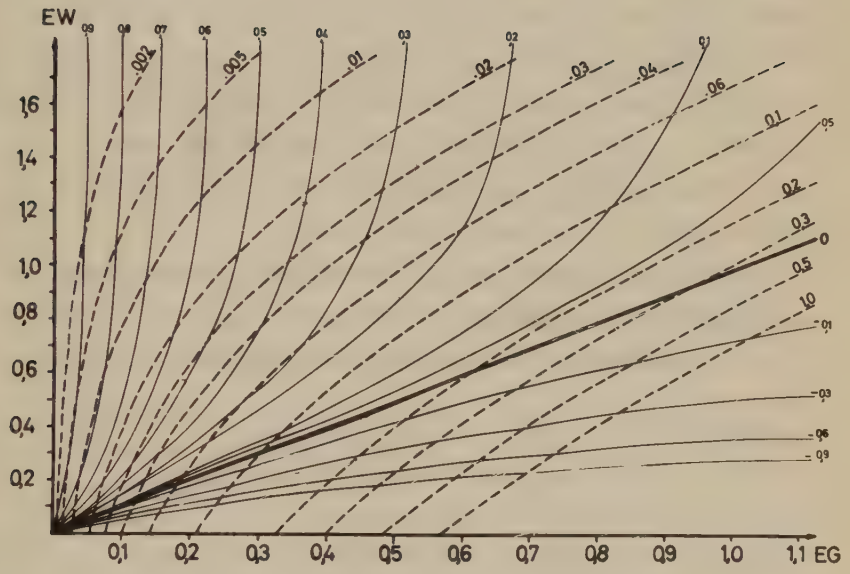


Abb.7.1.

Ausgezogene Kurven: gemessene Extinktion E_G als Funktion der "wahren" Extinktion E_W. Der Weißanteil w ist auf diesen Kurven konstant.
Gestrichelte Kurven: Hämoglobinspektren, bei denen die gemessene Extinktionsdifferenz ΔE zwischen 569nm und 580nm konstant ist, ergeben bei 580nm zwischen E_W und E_G diesen Zusammenhang. Der Weißanteil w ist Kurvenparameter.

Der jeweils konstante Wert w bzw. ΔE ist an die Kurven drangeschrieben.

Auf der Abbildung 7.1 sind einige Kurven für negative w-Werte eingezeichnet. Das ist mit Gleichung (7.31) rein formal möglich und hat auch eine praktische Bedeutung. Wie wir unten genauer darlegen, haben wir eine elektronische Zusatzapparatur zu dem Rapidspektrophotometer gebaut. Mit dieser Zusatzapparatur können wir den Weißanteil elektronisch kompensieren. Dabei ist es durchaus möglich, daß wir den Weißanteil überkompensieren, sei es aus Unkenntnis des wahren w-Wertes, oder sei es beabsichtigt aus meßtechnischen Gründen.

Um zum Beispiel bei inhomogenem im Meßfeld verteiltem Hämoglobin den Weißanteil ausrechnen zu können, betrachten wir vorerst ein Einkomponentensystem

$$E_W(\lambda) = \varepsilon(\lambda)\ c\ D. \qquad (7.32)$$

$\varepsilon(\lambda)$ ist der molare Extinktionskoeffizient und c die Konzentration der einen Komponente. D ist die Küvettendicke. Aus (7.31) ergibt sich die Beziehung

$$E_G(\lambda) = -\lg\left\{w + (1-w)\ 10^{-\varepsilon(\lambda)\ c\ D}\right\}. \qquad (7.33)$$

Wir möchten die Konzentration c und den Weißanteil w bestimmen. Dies gelingt bereits, wenn man für zwei verschiedene Wellenlängen λ_1 und λ_2 die Extinktion mißt. Aus der Gleichung (7.33) ergibt sich

$$E_G(\lambda_1) = -\lg\left\{w + (1-w)\ 10^{-\varepsilon(\lambda_1)\ c\ D}\right\} \qquad (7.34)$$

$$E_G(\lambda_2) = -\lg\left\{w + (1-w)\ 10^{-\varepsilon(\lambda_2)\ c\ D}\right\}. \qquad (7.35)$$

Die Gleichungen lösen wir nach cD auf und erhalten

$$cD = - \lg \left(\frac{E_G(\lambda_1) - w}{1 - w} \right)^{\frac{1}{\varepsilon(\lambda_1)}} \qquad (7.36)$$

$$cD = - \lg \left(\frac{E_G(\lambda_2) - w}{1 - w} \right)^{\frac{1}{\varepsilon(\lambda_2)}} \qquad (7.37)$$

Eliminieren wir cD, so folgt

$$\left(\frac{E_G(\lambda_1) - w}{1 - w} \right)^{\varepsilon(\lambda_2)} - \left(\frac{E_G(\lambda_2) - w}{1 - w} \right)^{\varepsilon(\lambda_1)} = 0 . \qquad (7.38)$$

Gesucht sind Nullstellen dieser Gleichung im Intervall $0 \leqq w \leqq 1$. Die Auflösung ist nicht durch einen geschlossenen Ausdruck mit Hilfe von elementaren Funktionen möglich.

Zum Aufsuchen der Nullstellen benutzen wir das folgende Verfahren. Die Funktion

$$F(w) = \left(\frac{E_G(\lambda_1) - w}{1 - w} \right)^{\varepsilon(\lambda_2)} - \left(\frac{E_G(\lambda_2) - w}{1 - w} \right)^{\varepsilon(\lambda_1)} \qquad (7.39)$$

ist, wie man aus der ersten Ableitung ersehen kann, für $0 \leqq w < 1$ eine streng monotone Funktion. Sie ist sicher in diesem halboffenen Gebiet auch stetig. F(w) kann in $0 \leqq w < 1$ daher höchstens eine Nullstelle besitzen. Ist eine Nullstelle vorhanden, so wird das Vorzeichen von F(w) im Intervall $0 \leqq w < 1$ einmal wechseln. Die Tatsache benutzen wir in dem Programm 67-11-D16 zur Berechnung des Weißanteiles. Als Lösung der Gleichung

$$F(w) = 0 \qquad (7.40)$$

erhalten wir

$$w = \lim_{\nu \to \infty} w_\nu \,. \tag{7.41}$$

Die Größen w_ν werden durch das folgende Iterationsverfahren bestimmt.

$$w_1 = \frac{1}{2}\,, \tag{7.42}$$

$$w_\nu = w_{\nu-1} - \operatorname{sgn}\left(\lim_{z \to 1} F(z)\right) \operatorname{sgn}\left(F(w_{\nu-1})\right) \frac{1}{2^\nu}\,. \tag{7.43}$$

sgn (x) ist die Signum-Funktion

$$\operatorname{sgn}(x) = \begin{cases} 1 \text{ für } x > 0 \\ 0 \text{ für } x = 0 \\ -1 \text{ für } x < 0 \end{cases} \tag{7.44}$$

Bei dem Grenzwert $\lim_{z \to 1} F(z)$ ist der rechtsseitige Grenzwert zu nehmen. Der Vorteil dieses Iterationsverfahrens ist, daß es bedingungslos anwendbar ist, relativ gut konvergiert und exakte Fehlerabschätzungen erlaubt. Der Fehler nach dem k. Schritt ist kleiner als 2^{-k}. Ist keine Nullstelle vorhanden, so lautet das Ergebnis

$$\lim_{\nu \to \infty} w_\nu = 0\,. \tag{7.45}$$

Dieses Ergebnis ist insofern sinnvoll, weil man dann weiß, daß kein Weißanteil bei der Probe dabei ist. Dieses Ergebnis ist mathematisch allerdings zweideutig. Es kann sein, daß w=0 eine Lösung der Gleichung (7.40) darstellt, oder es kann sein, daß im Intervall $0 \leqq w < 1$ keine Lösung vorhanden ist. Die Trennung dieser beiden Fälle ist sehr einfach durch die Berechnung von F(0)

möglich.

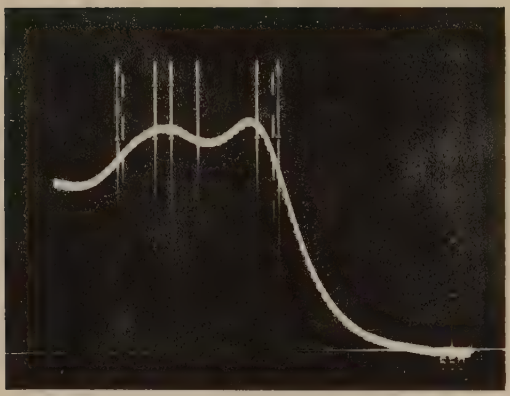
Zuerst haben wir versucht, die Nullstellen von F(w) mit Hilfe des Newtonschen Verfahrens oder durch das Verfahren der sukzessiven Approximation zu finden. Der Programmieraufwand in beiden Fällen war wesentlich größer. Für das Verfahren der sukzessiven Approximation

$$w_n = G(w_{n-1}) \qquad (7.46)$$

ist es uns nicht gelungen, eine Funktion G(w) zu finden, die für alle möglichen Fälle der Bedingung $|G'(w)| < 1$ im Intervall $0 \leq w < 1$ genügt. Man muß entweder umständliche Fallunterscheidungen treffen oder in Kauf nehmen, daß das Verfahren schlecht oder garnicht konvergiert.

Man kann die Gleichungen (7.34)u.(7.35) nicht nur für bestimmte Wertepaare lösen, sondern wir haben uns mit Hilfe des Rechners PDP8 Tabellen ausgeschrieben, in die man dann die entsprechenden Meßwerte einsetzen kann. Auf der Abbildung 7.1 (gestrichelte Kurve) sind für das Hämoglobin der Zusammenhang zwischen der "wahren" Extinktion E_W bei 580nm und der gemessenen Extinktion E_G bei 580nm aufgetragen. w, der Weißanteil, ist Kurvenparameter. ΔE, die gemessene Extinktionsdifferenz zwischen 569nm und 580nm, ist auf den gestrichelten Kurven konstant. Kennt man ΔE und E_G, so kann man aus der Abbildung 7.1 die w- und E_W-Werte entnehmen.

Es sei die Benutzung des Diagramms Abb.7.1 an einem Beispiel erläutert. Wir messen bei 569nm die Extinktion zu 0,46 O.E. und die Extinktion bei 580nm 0,40 O.E. Das heißt, der Wert für ΔE ist $\Delta E = 0{,}06$ O.E. Aus dem Diagramm



```
HAEMOGLOBIN-EXTINKTIONSKURVEN-AUSWERTUNG

                    KURVE +6

EINGEGEBENE EXTINKTIONSWERTE:
527 NM : K**+0.370000E+2     O.E.
542 NM : K**+0.420000E+2     O.E.
548 NM : K**+0.410000E+2     O.E.
558 NM : K**+0.370000E+2     O.E.
569 NM : K**+0.400000E+2     O.E.
578 NM : K**+0.410000E+2     O.E.
580 NM : K**+0.320000E+2     O.E.
APPARATEKONSTANTE: K=+0.750000E-2

AUSWERTUNG:

WEISSBEIMISCHUNG:W=+30    %

KONZENTRATIONSPROPORTIONALE GROESSE C=+0.487484E+0

. .S HB IST ZU :+46    % OXYDIERT
```

Abb.7.2. Oben: Spektrum von inhomogen im Meßfeld verteiltem Hämoglobin.
Unten: mit der PDP8 erzeugtes Auswertprotokoll zu dem Hämoglobinspektrum.

Abb.7.1 folgt damit für die "wahre" Extinktion E_W=0,80 O.E. und ein Weißanteil von w=0,29.

569nm und 580nm sind isosbestische Wellenlängen des Hämoglobinspektrums. Die Überlegungen gelten dadurch unabhängig vom Grad der Oxygenierung des Hämoglobins. Die isosbestischen Wellenlängen erweisen sich deshalb bei der Bestimmung des Weißanteils w als besonders geeignet.

Abb.7.2 zeigt die Extinktionskurve von inhomogen verteiltem Hämoglobin. Um den Weißanteil und den Oxydationsgrad des Hämoglobins zu bestimmen, braucht man mindestens die Extinktionswerte an drei verschiedenen Wellenlängen. Wir werteten noch weitere Meßpunkte aus und konnten so die Genauigkeit der Aussagen erhöhen. Die Auswertung ergab einen Weißanteil von 30%. Das Hämoglobin ist zu 46% oxygeniert. Unter der Abbildung befindet sich ein Photo des zugehörigen Auswertprotokolls, welches vom Rechner PDP8 erstellt wurde.

Um die Effekte der Kompartimentierung auch experimentell untersuchen zu können, haben wir uns eine Vorrichtung gebaut, die es erlaubt, einen ganz bestimmten Teil an weißem Licht unserem Signallicht beizumischen.

In Abb.7.3 ist dies mit einem Neodymfilter gemacht. Die obere Kurve zeigt das normale Bild, während die untere Kurve durch beigemischtes weißes Licht verzerrt ist. Man erkennt die nichtlineare Verzerrung daran, daß die Banden mit relativ hoher Extinktion stärker abgeflacht sind als die Banden mit niedriger Extinktion.

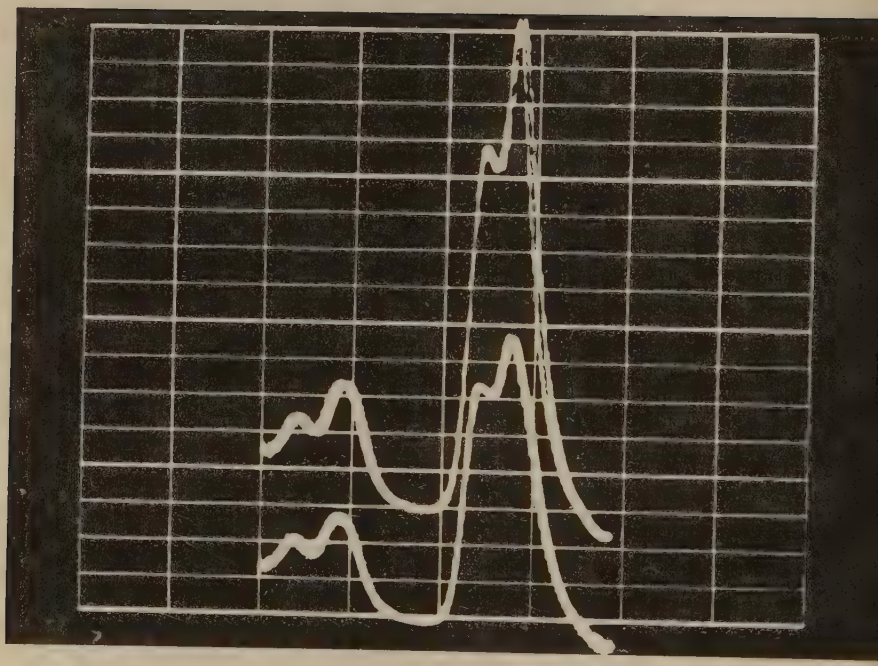


Abb.7.3.

Oberes Spektrum: ein Neodymfilter.
Unteres Spektrum: nicht lineare Verzerrung des Neodymfilterspektrums durch Zusatz von weißem Licht.

Der Ausgang des Photomultipliers liefert eine der Lichtintensität proportionale elektrische Spannung. Subtrahiert man eine für alle Wellenlängen gleiche Spannung von diesem Meßsignal, so ist man imstande, die Weißbeimischung elektronisch zu kompensieren. Allerdings muß der Weißanteil vorher bestimmt sein.

Für manche Fragestellungen ist es interessant, daß man elektronisch überkompensieren kann, wodurch sich eine nicht lineare Verstärkung des Meßsignals ergibt.

Auf der Abb.7.4 ist die elektronische Weißkompensation an einem Hämoglobinpräparat gezeigt. Das untere Bild ist das Hämoglobinsignal ohne Weißanteil. Die mittlere Abbildung zeigt das gleiche Präparat, wenn zusätzlich noch eine gewisse Menge weißes Licht in den Photomultiplier fällt. Das obere Bild entspricht dem mittleren Bild, nur daß dort der Weißanteil kompensiert ist.

Besonders augenfällig tritt die Abweichung vom Lambert-Beerschen Gesetz in folgenden Versuchen in Erscheinung. Wir betrachten die Höhe der β-Banden des voll oxygenierten Hämoglobins in Abhängigkeit von der Konzentration. Es wurde als Höhe der β-Bande die Extinktionsdifferenz zwischen 542 und 558nm genommen. Die Abb.7.5 zeigt das Meßergebnis bei verschiedenem Weißanteil w. Abgesehen von der Meßreihe mit w=0 zeigen alle Kurven den charakteristischen Abfall bei höheren Konzentrationen.

Wir konnten an diesen Meßwerten die oben beschriebenen Verfahren zur Berechnung des Weißanteils testen.

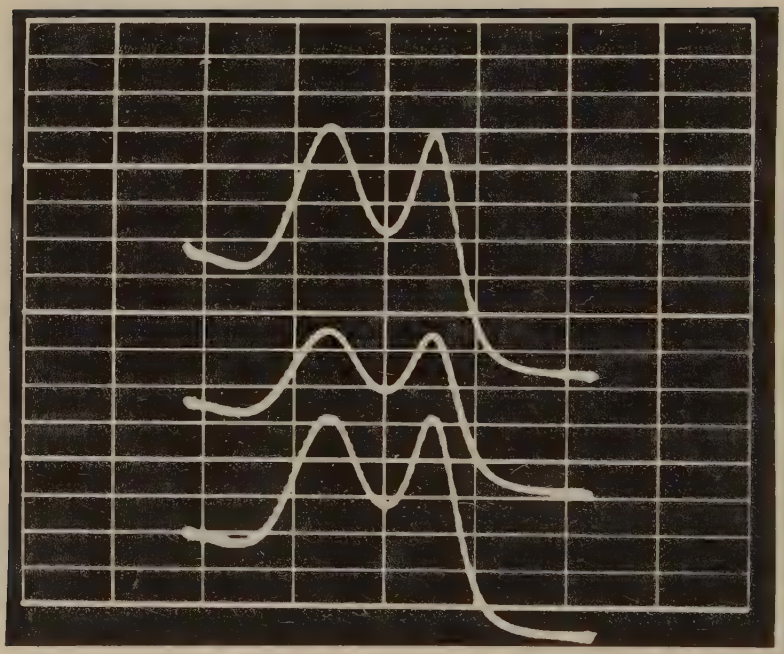


Abb.7.4.

Unteres Spektrum: homogen im Meßfeld verteiltes Hämoglobin.

Mittleres Spektrum: die gleiche Menge Hämoglobin inhomogen im Meßfeld verteilt.

Oberes Spektrum: die gleiche Probe wie in der Mitte. Der Effekt der inhomogenen Farbstoffverteilung wurde elektronisch kompensiert.

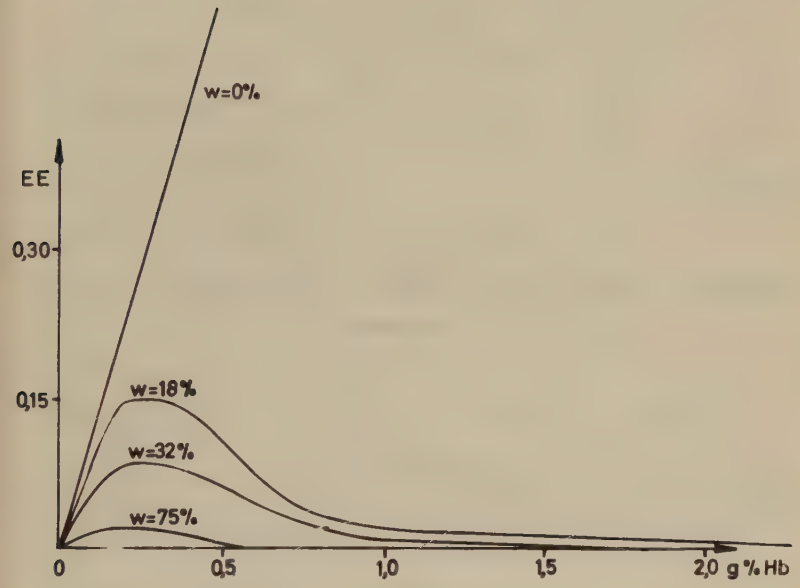


Abb.7.5.

Bei Hämoglobinspektren gemessene Extinktionsdifferenzen zwischen 542 und 558 nm in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration. Diese Extinktionskurven wurden für verschiedene Weißanteile w ermittelt.

Wir erhielten Werte, die bis auf einen Fehler von 2-3% mit den vorgegebenen Weißwerten übereinstimmten.

Die auf der Abb.7.5 wiedergegebenen Kurven lassen sich, wie folgt, auch errechnen. Aus den Gleichungen

$$E_G(\lambda_1) = - \lg\{w + (1-w)10^{-\varepsilon(\lambda_1)\, c\, D}\}, \qquad [7.34]$$

$$E_G(\lambda_2) = - \lg\{w + (1-w)10^{-\varepsilon(\lambda_2)\, c\, D}\} \qquad [7.35]$$

erhalten wir

$$\Delta E = E_G(\lambda_1) - E_G(\lambda_2) = \lg\left\{\frac{w + (1-w)10^{-\varepsilon(\lambda_2)\, c\, D}}{w + (1-w)10^{-\varepsilon(\lambda_1)\, c\, D}}\right\}$$

oder (7.47)

$$\Delta E = f(c, w). \qquad (7.48)$$

Wertet man diesen Ausdruck für verschiedene Weißanteile aus, so erhält man Kurven, die denen der Abb.7.5 entsprechen.

Diese zuletzt genannten Überlegungen und Versuche zeigen, daß gerade bei hohen Konzentrationen ein relativ geringer nicht beachteter Weißanteil die Messungen stark verfälschen kann. Das Lambert-Beersche Gesetz ist dann zur Berechnung der Konzentrationen nicht anwendbar.

Diskussion

Die Methoden zur Auswertung der Mehrkomponentensysteme der Kurzzeitspektrophotometrie hängen wesentlich von den zur Verfügung stehenden Apparaturen und den zu untersuchenden Objekten ab.

Ein wichtiges Anliegen der Physiologie ist es, möglichst wenig Eingriffe in die zu untersuchenden lebenden Organe vorzunehmen. Da die die Stoffwechsellage bestimmenden Atmungsfermente charakteristische Lichtabsorptionen zeigen, können die spektrophotometrischen Untersuchungen wesentliche Aufschlüsse über die Funktion der Organe liefern.[11,42,93] Man braucht wesentlich weniger strukturändernde Eingriffe vorzunehmen als es bei der chemischen Analyse nötig ist. Je schonender man mit Objekten umgehen will, desto mehr Aufwand in der Meßapparatur und der Auswertung ist nötig.

Bei der photometrischen Untersuchung lebender Organe ist man in den meisten Fällen auf die Reflexionsphotometrie angewiesen.[115] Da jedes Organ andere optische Eigenschaften hat, sind wir jeweils auf die im dritten Kapitel beschriebenen Voruntersuchungen zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeitsdichte des in dem betreffenden Organ zurückgelegten Weges angewiesen. Denn nur so wissen wir, welcher Weg in den Organen zurückgelegt wurde, und nur so können wir genaue Aussagen über den Zusammenhang zwischen der Intensität des reflektierten Lichtes und der Konzentration der Farbstoffe im Gewebe machen.

Die durch theoretische Überlegungen gewonnenen Beziehungen werden stets so sein, daß sie freie Parameter enthalten, die aus Versuchsergebnissen auf die jeweiligen Objekte abgestimmt werden müssen.[47,48,54,55] Es dürfte kaum möglich sein, ein für alle Organe zutreffendes mathematisches Modell zu entwickeln.

Bei blutdurchströmten Organen wird die Absorption des sichtbaren Lichtes ganz wesentlich vom Hämoglobin bestimmt. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, arbeiten wir an blutfrei perfundierten Organen.[62,44,128] Um eine genügende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, ist man vielfach gezwungen, in Hypothermie zu arbeiten.[99]

Das sind bereits Eingriffe, die man vom Standpunkte des Physiologen nach Möglichkeit vermeiden sollte. Lübbers schlägt deshalb vor, durch ein ausgeklügeltes Kompensationsverfahren die Hämoglobinsignale bereits am Eingang des Rapidspektrophotometers zu unterdrücken. Das erfordert eine besonders genaue Erfassung der Hämoglobinkonzentrationen. Das Verfahren ist nur mit einer etwas größeren und schnelleren Rechenmaschine als der PDP8 durchführbar. Während der Messungen müssen wir die Korrektursignale berechnen, dieses nimmt einen Teil der für die Auswertung zur Verfügung stehenden Rechenzeit und einen Teil des Kernspeicherplatzes in Anspruch. Wir benötigen außerdem einen zweiten direkten Datenkanal zur Ausgabe der Kompensationssignale.

Die gemessenen Spektren sind mit mehr oder minder großen Fehlern behaftet. Das Rauschen des Multipliers verursacht besonders im ultravioletten Licht statistisch verteilte Fehler. Je weniger Zeit für die Erfassung eines Meßwertes zur Verfügung steht, desto schlechter wird das Signal-Rauschverhältnis. Durch die beschriebenen Verfahren, die alle gemessenen Werte erfassen, sind wir in der Lage, diesen, durch die hohe Registriergeschwindigkeit bedingten Nachteil zu umgehen. Außerdem wird die technische Weiterentwicklung der Sekundärelektronenvervielfacher, insbesondere die Erhöhung der Quantenausbeute der Photokathode, eine Reduzierung dieses Fehlers möglich machen.

Weitere Fehler sind durch die Logarithmierstufe bedingt. Dieser Teil des Rapidspektrophotometers ist in den neusten Modellen sehr verbessert worden. Wir haben die Möglichkeit, die Logarithmierung mit Hilfe des Rechners vorzunehmen. Wir benötigen dazu allerdings einen Teil der für die Auswertung zur Verfügung stehenden Zeit.

Will man die Spektren zum Beispiel im Bereich des gesamten sichtbaren Lichtes erfassen, so werden die Linien der Xenonlampe(im Bereich:430-480nm)nicht vollständig ausgeregelt. Bei den neuen Modellen des Rapidspektrophotometers ist die Zahl der Meßpunkte je Spektrum deshalb auf 500 erhöht worden. Durch diese Verdopplung der Meßrate muß die Auswertung des einzelnen Meßwertes entsprechend schneller durchgeführt werden. Will

man die Auswertung während der Messung durchführen, so kommt man nicht umhin, einen größeren und schnelleren elektronischen Rechner einzusetzen.

Bei der Auswertung eines N-Komponentensystemes bei rein multiplikativer Farbmischung ist es gelungen, das Auswertverfahren anzugeben mit dem kleinsten zu erwartenden Fehler für die Konzentrationen x_ν. Dabei wurde angenommen, daß die in den Konzentrationen auftretenden Fehler durch das gemessene Summenspektrum bedingt sind. Die Spektren der Grundkomponenten werden als hinreichend genau bekannt vorausgesetzt. Das ist durchaus sinnvoll; denn die Grundkomponenten können vor den Versuchen in langsamer Registrierung aufgenommen werden. Statistisch verteilte Fehler können so durch Mittelwertbildung weitgehend vermieden werden. Ein nicht zu übersehendes Problem stellen die systematischen Fehler dar. Die Erfassung und Vermeidung durch Korrekturglieder wird weitgehend möglich sein.

Es wird vorkommen, daß unbekannte Komponenten in den Summenspektren enthalten sind. Stimmen die aus den errechneten Konzentrationen zurückgerechneten Summenspektren (Siehe Anhang: Programm 67-10-D4) nicht weitgehend mit den gemessenen Spektren überein, so muß man annehmen, daß die Proben durch unbekannte Stoffe verunreinigt sind. Ein anderes Verfahren besteht darin, daß man sich Elemente des bei der Auswertung betrachteten Hilbert-Raumes, die orthogonal zu den durch die Grundkomponenten

aufgespannten Teilraum sind, konstruiert. Im Idealfall würde man sich eine zusammen mit den Grundkomponenten vollständige Basis des Hilbert-Raumes konstruieren. Sind die Skalarprodukte derartiger Elemente mit den gemessenen Summenspektren größer als eine festzulegende Schranke, so wird man annehmen müssen, daß unbekannte Komponenten die Summenspektren verfälschen. Bei stärker verunreinigten Proben kann man von der zusätzlichen Information Gebrauch machen, daß die Konzentrationen nicht negativ sein können. Erhält man einen negativen Konzentrationswert, so wird man diesen Wert Null setzen und das überbleibende (N-1)-Komponentensystem analysieren.

Auch erwähnen möchten wir, daß bei der Wellenlängenzuordnung der Spektren Fehler auftreten können. In vielen Fällen wird man diesen Fehler dadurch weitgehend reduzieren können, daß man die Grundkomponenten und die Summenspektren mit dem gleichen Photometer und unter sonst gleichen Voraussetzungen aufnimmt.

Für das beschriebene Auswertverfahren mit dem kleinsten zu erwartenden Fehler muß die Grundkomponente $\varphi_\nu(\lambda)$ linear unabhängig von den übrigen $\varphi_\mu(\lambda)$ mit $\mu \neq \nu$ sein, wenn die Konzentration x_ν errechnet werden soll. Es gelang, das Auswertverfahren für x_ν so zu konstruieren, daß es auch ohne zusätzliche Überlegungen durchführbar ist, wenn die $\varphi_\mu(\lambda)$ mit $\mu \neq \nu$ nicht voneinander linear unabhängig sind.

Errechnet man die Konzentration x_ν, zum Beispiel mit

der N-Punktemethode durch die Lösung eines linearen Gleichungssystemes (siehe Formel(4.7) oder(4.24-4.25)), so versagt die Methode wegen der verschwindenden Determinanten bereits, sobald die Gesamtheit der $\varphi_\mu(\lambda)$ linear abhängig sind. Die speziell betrachtete Funktion $\varphi_\nu(\lambda)$ kann dabei durchaus linear unabhängig von den $\varphi_\mu(\lambda)$ mit $\mu \neq \nu$ sein. Bei der Auflösung der linearen Gleichungssysteme, etwa mit dem Gaußschen Algorithmus, wird man bereits durch die Rundungsfehler ungenaue Ergebnisse erhalten, wenn die Pivotelemente eine gewisse Schranke unterschreiten.

Das beschriebene Auswertverfahren mit dem kleinsten zu erwartenden Fehler kann nicht nur für rein multiplikative Farbmischungen angewandt werden, sondern auch bei einer noch umfassenderen Klasse von Farbmischungen. Das Verfahren wurde hier nur im Rahmen der rein multiplikativen Farbmischung behandelt. Es wird bei homogenen Stoffgemischen in der Probe in den meisten Fällen möglich sein, eine Funktion

$$y(\lambda) = F(L(\lambda), L_0(\lambda))$$

zu finden, die der Beziehung

$$y(\lambda) = \sum_{\nu=1}^{N} x_\nu \varphi_\nu(\lambda) \qquad [4.4]$$

genügt. $L_0(\lambda)$ ist die auf die Probe gegebene Lichtintensität. $L(\lambda)$ ist die aus der Probe herauskommende Lichtintensität.

So läßt sich im Falle der Reflexionsphotometrie bei homogen verteilten Farbstoffen aus der Beziehung

(5.123), zumindest numerisch, ein dem Ausdruck (5.74) entsprechender Zusammenhang gewinnen. Dabei muß man allerdings die Wahrscheinlichkeitsdichte des in der Probe zurückgelegten Weges vorher bestimmt haben.

Die Kombination von additiver und multiplikativer Farbmischung konnten wir hier nur in Spezialfällen erschöpfend theoretisch behandeln und experimentell erproben. Im Falle des Hämoglobins konnten wir sicher nachweisen, daß die Kompartimentierung der Farbstoffe in den Objekten eine nicht zu übersehende Rolle spielt. Die Kompartimentierung fällt dann ins Gewicht, wenn der Durchmesser der Kompartimente nicht wesentlich kleiner ist als die mit der Photometrie erfaßte Schichtdicke. Ein relativ grobes Modell, welches die inhomogene Farbstoffverteilung berücksichtigt, dürfte wesentlich besser sein, als wenn man diese Effekte ganz unberücksichtigt läßt. Wir können durch aufwendige numerische Auswertmethoden eine ganze Reihe von Verteilungsparametern berechnen. Wichtig dabei ist, daß man sich überlegt, wieviel Information diese Parameter enthalten, ob nicht durch die unvermeidbaren Meßungenauigkeiten der Spektren und die relativ aufwendigen Ausrechenverfahren die Fehlerfortpflanzung so ungünstig ist, daß man mit den Resultaten kaum etwas aussagen kann.

Die Verfeinerung und Verbesserung der Meß- und Auswerttechnik, wie die Konstruktion des Rapidspektrophotometers und die direkte Übernahme der Meßwerte in den

Kernspeicher einer elektronischen Rechenmaschine, haben erst die Voraussetzungen geschaffen für die Analyse von inhomogenen Farbstoffgemischen in lebenden Organen. Eine weitere Verbesserung der Methode wird auch hier die Möglichkeiten für noch verfeinerte Resultate schaffen.

Zusammenfassung

1.) Bei rein multiplikativer Farbmischung wird mit Hilfe abstrakter Überlegungen im Hilbert-Raum das Auswertverfahren angegeben, welches den kleinsten Fehler für die zu errechnenden Farbstoffkonzentrationen erwarten läßt. Es gelingt damit, alle Information, die in den Summenspektren über die Farbstoffkonzentrationen enthalten ist, zu erfassen. Es werden Fehlerabschätzungen für die verschiedenen, möglichen Auswertverfahren angegeben.

2.) Mit der elektronischen Rechenmaschine PDP8 gelingt es, die Mehrkomponentenanalyse während der Messung nach drei Komponenten durchzuführen. Diese Analyse, die mit Hilfe von gespeicherten Logarithmentabellen durchgeführt wird, erfolgt unter Verwendung aller Meßwerte.

3.) Es gelang, eine Modifikation des Auswertverfahrens anzugeben, die, ohne allzu große Einbuße an Genauigkeit, die Durchführung mit einem Analog- beziehungsweise einem Hybridrechner ermöglicht.

4.) Die Unterdrückung von Gleichspannungsanteilen oder allgemeinere lineare Transformationen der Meßsignale können in den Auswertverfahren berücksichtigt werden. Es konnte gezeigt werden, daß man bei Wechselstromkopplung vom Meßbereich abhängende isos-

bestische Punkte finden kann.

5.) Der Matrizantenformalismus erweist sich besonders geeignet zur Beschreibung der Lichtausbreitung in den Objekten. Es werden für trübe Medien Beziehungen für die Intensität des reflektierten und des durchfallenden Lichtes angegeben. Diese Beziehungen werden mit den aus Messungen gewonnenen Resultaten verglichen.

6.) Am Meerschweinchengehirn haben wir die für die Reflexionsphotometrie sehr wesentlichen Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen für den im Gewebe zurückgelegten Weg gemessen beziehungsweise berechnet. Es gelang, die Form der gefundenen Kurven theoretisch zu verstehen.

7.) Es werden Kombinationen von additiven und multiplikativen Farbmischungen untersucht. Für spezielle Systeme konnten Auswertverfahren angegeben und erprobt werden.

Literaturverzeichnis

(1) Adcock, W.A.: Rev. Sci. Instruments 19, 181 (1948).

(2) Amy, L.: Rev. Opt. 16, 81 (1957).

(3) Anderson, N.M. and P.Sekelj: Studies on the Light Transmission of nonhemolyzed whole Blood. Determination of oxygen saturation. J.Lab. and clin. Med. 65, 153 (1965).

(4) Bauer, L.F., J.Helmhold, K.Samelson und R.Sauer: Moderne Rechenanlagen. Stuttgart 1965.

(5) Berry, C.E.: J. appl. Physics 17, 262 (1946)

(6) Born, M. and Wolf: Principles of Optics. London 1959.

(7) Brenner, H.: Physica 15, 593 (1949).

(8) Brügel, W.: Einführung in die Ultrarotspektroskopie. Darmstadt 1962.

(9) Budden, K.J.: Radio Waves in the Ionosshere, Cambridge 1961.

(10) Budden, K.J. and P.C.Clemmow: Proc. Cambr. Phil.Soc. 53, 669 (1957).

(11) Chance, B.: Spektrophotometrie of intracellular respiratory pigments. Science 120, 767 (1954).

(12) Chu, C.M. and S.W.Churchill: Representation of the Angular Distribution of Radiation Scattered by a Spherical Particel. J. opt.Soc. An. 45, 958 (1955).

(13) Clemmow, P.C. and I.Heading: Proc.Cambr.Phil.Soc.50, 319 (1954).

(14) Courant, R. und O.Hilbert: Methoden der mathematischen Physik I. Berlin 1937.

(15) Davis, G.E.: Scattering of Light by an Air Bubble in Water. J.opt.Soc.Am. 45, 572 (1955).

(16) Doetsch, G.: Handbuch der Laplace-Transformation I, II und III. Basel 1950, 1955 und 1956.

(17) Doetsch, G.: Anleitung zum praktischen Gebrauch der Laplace-Transformation. München 1956.

(18) Dold, B.: Graphische Verfahren zur Ermittlung optischer Konstanten absorbierender Substanzen aus den Daten der Schwingungsellipse des reflektierten Lichtes. Optik 22, 519 (1965).

(19) Duysens, L.N.M.: The Flattering of the Absorption Spectrum of Suspensions as Comared to That of Solutions. Biochim. et Biophys. Acta 19, 1 (1956).

(20) Fabel, H. und D.W.Lübbers: Measurements of reflection spectra of the beating rabbit heart in situ. Bio. Z. 341, 351 (1965).

(21) Försterling, K. und H.D.Wüster: Ann. Phys. (Leipzig) 8, 129 (1950).

(22) Försterling, K.: Arch. elektr. Ubertr. 3, 115 (1949).

(23) Frank, H.P. and R.Ullman: Determination of Dissymmetry of Scattering in Colored Solutions. J. opt.Soc.Am. 45, 471 (1955).

(24) French, C.S.: Derivative Spectrophotometry. Preprint of a paper for the "Symposium on Instrumentation and Contral", sponsored by Nothern Califormia Section of Instrument Society of America at Berkelly, California. (1957).

(25) Frey,P.: Informationstheorie. Berlin 1966.

(26) Gantmacher, F.R.: Matrizenrechnung II. Berlin 1959.

(27) Gelder, B. and E.Slater: The Extinctions-Coefficients of Cytochromes a and a_3. Information Exchange Group No. 1 (1965).

(28) Giese, A.T. and C.S.French: The Analysis of overlapping spectral absorption bands by derivative spectrophotometry. Appl. Spectroscopy 9 No.2 (1955).

(29) Ginzburg, V.L.: Propagation of elektromagnetic Waves in Plasma. Amsterdam 1961.

(30) Goldberger, R. und D.E.Green: Properties and Functions of Mammalian Cytochromes b and c_1. Enzymes 91, (1963).

(31) Golubew, W.W.: Differentialgleichungen im Komplexen. Berlin 1958).

(32) Hamel, G.: Integralgleichungen. Berlin 1949.

(33) Hampel, B.: Absorptionsspektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich. Braunschweig 1962.

(34) Heilmeyer, L.: Medizinische Spektrophotometrie. Jena 1933.

(35) Hohorst, H.J.: Der Reduktionszustand des Diphosphopyridin-Nucleotidsystems in lebendem Gewebe. Eine Studie über Metabolitgleichgewichte in der Rattenleberzelle. Phil.Diss.Marburg 1960.

(36) Iwanenko, D. und A.Sokolow: Klassische Feldtheorie. Berlin 1953.

(37) Jacquez, J.A. and Kuppenheim, H.F.: Theory of the Integrating Sphere. J.opt.Soc.Am. 45, 460 (1955).

(38) Jacquez, J.A., W.M. Keehan, J.Huss, J.M.Dimitroff and H.F.Kuppenheim: Integrating Sphere for the Measurement of Reflectance with the Bechmann Model DR Recording Spectrophotometer. J.opt. Soc.Am. 45, 971 (1955).

(39) Jöbsis, F.F.: Spectrophotometrie studies in intact muscle. J.Gen.Physiol. 46, 929 (1963).

(40) Kantorowitsch, L.W. und W.I.Krylow: Näherungsmethoden der höheren Analysis. Berlin 1956.

(41) Karlson, P.: Biochemie. Stuttgart 1964.

(42) Kästner, S.: Vektoren, Tensoren, Spinoren. Berlin 1960.

(43) Klingenberg, M. und D.W.Lübbers: Oxydative Endstrekke des Stoffwechsels. Glukose - Handbuch 1965.

(44) Knaust, K.: Sauerstoffversorgung des hämoglobinfrei perfundierten Meerschweinchengehirnes bei Normo- und Hypothermie. Med.Diss.Marburg 1967.

(45) Kortüm, G.: Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie. Berlin 1962.

(46) Kortüm, G. und M.Kortüm-Seiler: Z.Naturforschung 5a, 544 (1950).

(47) Kortüm, G. und J.Vogel: Die Theorie der diffusen Reflexion von Licht an pulverförmigen Stoffen. Z.physik.chem. (Neue Folge) 18, 109 (1958).

(48) Kortüm, G. und J.Vogel: Über reguläre und diffuse Reflexion an Pulvern und ihre Abhängigkeit von der Korngröße. Z.physik.chem. (Neue Folge) 18, 229 (1958).

(49) K.Kramer, J.Elam, G.Saxton and W.Elam: Influence of Oxygen Saturation, Erythrocyte Concentration and

Optical Depth Upon the Red and Near-Infrared Light Transmttance of Whole Blood. Amer.J.Physiol. 165, 229 (1951).

(50) Kramer, K., K.Graf und W.Overbeck: Photoelektrische Reflektometrie an tierischen Organen. Pflügers Arch. ges.Physiol. 262, 285 (1956).

(51) Kramer, K. und Ulrich K.J.: Pflügers Archiv ges. Physiol. 266, 54 (1957).

(52) Kramer, K. und Ulrich K.: Pflügers Archiv ges.Physiol. 267, 251 (1958). O_2 Sättigung und Hb-Gehalt des Kapillarblutes der Nierenrinde.

(53) Kreyszig, E.: Statistische Methoden und ihre Anwendungen. Göttingen 1967.

(54) Kubelka, P. und F.Munk: Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche. Z.techn.Physik, 12, 593 (1931).

(55) Kubelka, P.: New Contributions to the Optics of Intensely Light-Scattering Materials. J.opt.Soc. Am. 38, 448 (1948).

(56) Landau, L.D. und E.M.Lipschitz: Feldtheorie. Berlin 1963.

(57) Lang, W. und R.Herrmann: Signal - zu - Rauschverhältnis bei flammenphotometrischen Absorptionsmessungen. Optik 20, 347 (1963).

(58) Latimer, P. and H.Eubanks: Absorption Spectrophotometry of Turbid Suspensions. Arch.Biochem.Biophys. 98, 274 (1962).

(59) Lighthill, M.J.: Einführung in die Theorie der Fourieranalysis und der verallgemeinerten Funktionen. Mannheim 1966.

(60) Livingston, P.M.: Multiple Scattering of Light in a Turbulent Atmosphere. J.opt.Soc.Am. 56,1660(1966).

(61) Löwe, F.: Optische Messungen. Dresden (1949).

(62) Lübbers, D.W., M.Kessler, R.Scholz und T.Bücher: Cytochrome reflection spectra and fluorescence of the isolated perfused, hemoglobin-free rat liver during a cycle of anoxia. Bio. Z. 341, 346 (1965).

(63) Lübbers, D.W. und W.Niesel: Über die Auswertung von spektralen Veränderungen in biologischen Objekten. Naturwiss. 44, 59 (1957).

(64) Lübbers, D.W. und W.Niesel: Ein Kurzzeit-Spektralanalysator zur Registrierung rasch verlaufender Änderungen der Absorption. Naturwiss. 44, 60 (1957).

(65) Lübbers, D.W. und W.Niesel: Der Kurzzeit-Spektralanalysator. Ein schnell arbeitendes Spektralphotometer zur laufenden Messung von Absorptions- beziehungsweise Extinktionsspektren. Pflügers Arch. ges.Physiol. 268, 286 (1959).

(66) Macke, W.: Wellen. Leipzig 1958.

(67) Madelung, E.: Die mathematischen Hilfsmittel des Physikers. Berlin 1957.

(68) Michlin, S.G.: Vorlesungen über lineare Integralgleichungen. Berlin 1962.

(69) Mie, G.: Beitrag zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. Ann.der Physik, 25, 377 (1908).

(70) Mortimer, L. and M.D.Mendelsohn: The Two-Wavelength Method of Microspectrophotometrie I, II, III. J.Biophysic and Biochem.Cytol 4, 407 (1958).

(71) Müller,D.: Programmierung elektronischer Rechenanlagen. Mannheim 1964.

(72) Neuringer, J.L.: Extinction and Scattering Cross Sections by Magnetically Lossy Particles in the Rayleigh-Scattering Limit. J.opt.Soc.Am. 56, 1652 (1966).

(73) Niesel, W., D.W.Lübbers und G.Thews: Die Verfolgung schneller Reaktionen durch Aufnahme von Summenspektren mit Hilfe des Kurzzeitspektralanalysators. Z.elektr.Chemie, Ber.Bunsen ges. phys.Chemie 64, 15 (1960).

(74) Niesel, W., D.W.Lübbers, D.Schneewolf, J.Richter und W.Botticher: Double Beam spectrometer with 10msec recording time. J.Rev.Scient.Instrum. 35, 578 (1964).

(75) Niesel, W., G.Thews und D.W.Lübbers: Die Messung des zeitlichen Verlaufs der O_2-Aufsättigung und O_2-Entsättigung menschlicher Erythrozyten mit dem Kurzzeit-Spektralanalysator. Pflügers Arch. ges.Physiol. 268, 296 (1959).

(76) Nikolai, L.: Über Sichtbarmachung, Verlauf und chemische Kinetik der Oxyhämoglobinreduktion im lebenden Gewebe, besonders in der menschlichen Haut. Pflügers Arch.ges.Physiol.229, 372 (1954).

(77) Nilson, N.: Ein linear anzeigendes Oximeter. Pflügers Arch.ges.Physiol. 263, 374 (1956).

(78) Noble, B.: Numerisches Rechnen. Mannheim 1966.

(79) Novobatzky, K.F. und T.Neugebauer: Theoretische Elektrizitätslehre und Wellenoptik. Berlin 1957.

(80) Ornstein, L.: The Distributional Error in Microspectrophotometry. Lab. Investigation 1, 251 (1952).

(81) Patau,K.: Absorption Microphotometry of Irregular-Shaped Objects. Chromosoma 5 341 (1952).

(82) Pestemer, M.: Anleitung zum Messen von Absorptionsspektren im Ultravioletten und Sichtbaren. Stuttgart 1964.

(83) Pohl, R.W.: Optik und Atomphysik. Berlin 1958.

(84) Pollister, A.W. and H.H.Swift: Molecular orientation and intracellular photometric analysis. Science 3, 68 (1950).

(85) Poloshi, G.N.: Mathematisches Praktikum. Leipzig 1963.

(86) Rao, C.N.R.: Chemical Applications of Infared Spectroscopy. New York 1963.

(87) Rapoport, S.M.: Medizinische Biochemie. Berlin 1965.

(88) Raschewski, F.K.: Riemannsche Geometrie und Tensoranalysis. Berlin 1959.

(89) Rawer, K.: Ann.Phys. (Leipzig) 35, 385 (1939).

(90) Reegler, E.: Streufunktion von Rauch und künstlichem Nebel im Labor. Optik 4, 194 (1948).

(91) Reichert, W.J.: The Theory and Construction of Oximeters. Erschienen in: Payne J.P. and D.W.Hill: A Syposium on Oxygen Measurements in Blood and Tissues. London 1966.

(92) Riesz, F. und B.Nagy: Vorlesungen über Funktionalanalysis. Berlin 1956.

(93) Rodrigo, F.A.: Determination of Oxygenation of in vitro by using reflected Light. Amer.Heat. J. 45, 809 (1953).

(94) Roessler, F. und L.Horlacher: Optische Eigenschaften von Magnesiumoxydteilchen. Optik 19, 451 (1962).

(95) Rupp, J.C. and W.F.H.M.Mommaerts: The Scattering of light in Myosin solutions. J.Biol.chem. 224 227 (1957).

(96) Schmidt, K. und W.Niesel: Messung der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins am durchbluteten Gewebe im reflektierten Licht mit dem Rapidspektroskop. Pflügers Arch.ges.Physiol. 280, 369 (1964).

(97) Schollmeyer, P. und M.Klingenberg: Über den Cytochromgehalt tierischer Gewebe. Biochem.Z. 335, 426 (1962).

(98) Schreyer, G.: Die Theorie der diffusen Reflexion von Licht an pulverförmigen Stoffen. Z.physik.chem. (Neue Folge) 12, 359 (1957).

(99) Schwickardi, D.: Konzentration und Kinetik der Atmungsfermente am isoliert perfundierten Meerschweinchengehirn in vivo und in Hypothermie von 18°C. Med.Diss.Marburg 1967.

(100) Scott, J.F.: Problems of scattering and spectral anomalies in microabsorption spectrophotometry. Lab. Investigation 1, 73 (1953).

(101) Sehera, Z.: Scattering Matrices and Reciprocity Relationships for Various Representations of the State of Polarisation. J.opt.Soc.Am. 56, 1732 (1966).

(102) Shibata, K.: Spectrophotometry of intact biological Materials. J.Biochem. 45, 599 (1958).

(103) Smirnow, W.J.: Lehrgang der höheren Mathematik. Band I-V. Berlin 1962.

(104) Sommerfeld, A.: Optik. Leipzig 1959.

(105) Stenius, A.S.: Influence of Optical Geometry and Absorption Coefficient on Diffuse Reflectance Value. J.opt.Soc.Am. 45, 727 (1955).

(106) Stiefel, E.: Über diskrete und lineare Tschebyscheff-Approximationen. Num.Math. 1, 1 1959.

(107) Stiefel, E.: Einführung in die numerische Mathematik. Stuttgart 1965.

(108) Suchy, K.: Ann.Phys (Leipzig) 11, 113 (1952).

(109) Suchy, K.: Ann. Phys. (Leipzig) 12, 423 (1952).

(110) Suchy, K.: Ann.Phys. (Leipzig) 13, 178 (1953).

(111) Suchy, K.: Ann.Phys. (Leipzig) 14, 411 (1954).

(112) Suchy, K.: Advances in Upper Atmosphere Research. Pergamon Press, Oxford (1963).

(113) Thews, G. und D.W.Lübbers: Ein schnell registrierendes Absorptionsspektralphotometer. Z.Angew. Phys. 7, 325 (1955).

(114) Unsöld, A.: Physik der Sternatmosphären. Berlin 1955.

(115) Van Cittert, P.H.: Physica, 6, 840 (1939).

(116) Van der Waerden, B.L.: Mathematische Statistik. Berlin 1965.

(117) Venkstern, T.V. and A.A.Baev: Absorption Spectra of Minor Bases. New York 1965.

(118) Volland, H.: Arch.elektr.Übertr. 16, 328 (1962).

(119) Volland, H.: Arch.elektr.Übertr. 16, 515 (1962).

(120) Volz, F.: Lichtstreuung, Polarisation und Extinktion von Salmiak- und Zigarettenrauch. Optik 20, 293 (1963).

(121) Wever, R.: Untersuchungen zur Extinktion von strömendem Blut. Pflügers Archiv ges.Physiol.259, 97 (1954).

(122) Whittacker,E.T. and G.N.Watson: A Course of Modern Analysis. Cambridge 1952.

(123) Wodick,R.: Ausbreitung elektromagnetischer Wellen in einem inhomogenen anisotropen Medium. Diplomarbeit in theor.Physik, Marburg (Lahn) 1963.

(124) Wodick,R., D.W.Lübbers und E.Piontek: Mehrkomponentenanalyse von Summenspektren unter Verwendung des gesamten gemessenen Spektralbereiches. Pflügers Arch. 297, 94 (1967).

(125) Wodick,R., D.Schwickardi und D.W.Lübbers: Konzentration und Kinetik der Atmungsfermente im Meerschweinchengehirn in vivo. Pflügers Arch. 291, 25 (1966).

(126) Woodward,P.H. und A.M.Woodward: Phil.Mag. and Jour.Sci. 37, 236 (1946).

(127) Wolter,H.: Physikalische Begründung eines Farbenkreises und Ansätze zu einer physikalischen Farbenlehre. Ann.Physik (6) 8, 12 (1950).

(128) Wolter,H.: Handbuch der Physik. (Herausgeber S.Flügge) 24, 567 und 630 (1955).

(129) Wolter,H.: Zur Messung physikalischer Größen mit Hilfe der Farben. Ann. Physik (6) 17, 329 (1956).

(130) Wolter,H.: Die Grundtheoreme der Informationstheorie als Folge der Fehlerfortpflanzungsgesetze bei der Auflösung von Faltungsintegralgleichungen. A.E.U. 13, 101 (1959).

(131) Wolter,H.: Angewandte Optik I (Geometrische Optik). Vorlesungsskripte, Marburg W.S.1960/61.

(132) Wolter,H.: Angewandte Optik II (Interferenzoptik). Vorlesungsskripte, Marburg S.S. 1961.

(133) Wolter,H.: Angewandte Optik III (Schlierenoptik). Vorlesungsskripte, Marburg W.S. 1961/62.

(134) Wolter,H.: Wechselstromlehre. Vorlesungsskripte, Marburg S.S. 1962.

(135) Wolter,H.: Vierpoltheorie. Vorlesung, Marburg W.S. 1962/63.

(136) Wolter,H.: Farboperatoren und ihre Darstellungen durch Matrizen und Integralkerne. Ann. Physik (7) 16, 184 (1965).

(137) Wolter,H.: Die Beziehung zwischen den Sampling-theoremen erster, zweiter und dritter Art. A.E.Ü. 20, 103 (1966).

(138) Wulrich,B.S.: Funktionalanalysis I und II, Leipzig 1961.

Abbildungen

Abb.1.1. basiert auf einer Abbildung aus Lit.(91).

Abb.1.3, 1.4, 1.5. wurden unter Mitbenutzung von Werten aus Lit. (30) gezeichnet.

Abb.2.1. ist aus einem Prospekt der Herstellerfirma des Rapidspektrophotometers entnommen.

Abb.2.5. basiert auf Untersuchungen und einer Abbildung der Herstellerfirma des Rapidspektrophotometers.

Dem Direktor des Institutes für Angewandte Physiologie, Herrn Prof.Dr.Lübbers, bin ich sehr dankbar, daß er durch großzügige Anschaffungen und andere Unterstützungen es möglich machte, daß ich eine derartige Arbeit in seinem Institut anfertigen konnte.

Da Prof.Dr.Lübbers das Rapidspektrophotometer selbst entwickelt und das erste Modell selbst gebaut hat, ist er auf das Genauste mit den Meß- und Auswertproblemen vertraut. Aus diesen Gründen konnte ich mir keinen besseren Ratgeber wünschen. Ich konnte auf seine jahrelangen Erfahrungen aufbauen und so ohne unnötige Umwege die auftretenden Probleme bearbeiten.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof.Dr.Wolter, danke ich besonders herzlich für sich als recht fruchtbar erwiesene Hinweise zur Erfassung und Bearbeitung der Probleme.

Lebenslauf

Am 6. Juli 1936 wurde ich als Sohn des Studienrates Edmund Wodick und dessen Ehefrau Grete Wodick, geborene Meißner, in Großhansdorf, einem Vorort von Hamburg, geboren.

Nach einer damals vorübergehend eingeführten sechsjährigen Grundschulzeit besuchte ich ab Ostern 1950 den naturwissenschaftlichen Zweig der Oberschule in Ahrensburg.

Nach dem Abitur Ostern 1957 begann ich in Hamburg Physik und Mathematik zu studieren. Nach dem Vordiplom in Physik wechselte ich nach Marburg über. Meine Diplomarbeit in Physik fertigte ich in Marburg unter Anleitung von Prof.Dr.Hückel und nach dessen Emeritierung unter Anleitung seines ehemaligen Assistenten Prof.Dr.Suchy an. Im Herbst 1963 legte ich mein Diplomexamen ab. Seit Anfang 1965 bin ich wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof.Dr.Lübbers, dem Direktor des Institutes für Angewandte Physiologie in Marburg. Da ich auch nach der Promotion noch weiter in der Physiologie arbeiten möchte, studiere ich nebenher Medizin. Im Frühjahr 1967 bestand ich das Physikum.